

Der Purinalkaloid-Chlorogensäure-Komplex

**Seine physikalisch-chemische Natur und seine Bedeutung in der
Gewebekultur und in den Blättern von *Coffea arabica* L.**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich**

von
Andreas Walter Kappeler
von Klingnau AG

Begutachtet von den Herren PD Dr. T.W. Baumann
und Prof. Dr. Ph. Matile

Zürich 1988
ADAG Administration & Druck AG



Der Purinalkaloid-Chlorogensäure-Komplex

**Seine physikalisch-chemische Natur und seine Bedeutung in der
Gewebekultur und in den Blättern von *Coffea arabica* L.**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich

von
Andreas Walter Kappeler
von Klingnau AG

Begutachtet von den Herren PD Dr. T.W. Baumann
und Prof. Dr. Ph. Matile

Zürich 1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

*Für meine Grossmutter,
Mutter und
Michèle*

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	9
2 MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Pflanzenmaterial	13
2.1.1 Klimakammern und Konstantraum	13
2.1.2 Gewebekulturen	14
2.1.2.1 Medien	14
2.1.2.2 Steriltechnik	14
2.1.2.2.1 Kultivationsbedingungen	15
2.1.2.2.2 Probeentnahme	16
2.1.3 Kurzzeit-Auswaschversuche	16
2.2 Analytik	17
2.2.1 Frisch- und Trockengewicht	17
2.2.2 Chlorophyllbestimmung	17
2.2.3 Theobromin- und Coffeinbestimmung	18
2.2.4 Chlorogensäurebestimmung	19
2.2.5 Glucose-, Fructose- und Saccharosebestimmung	19
2.2.6 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	20
2.3 Untersuchung von Komplexreaktionen	21
2.3.1 Die Verteilungsmethode	21
2.3.2 Die spektrophotometrische Methode	23
2.3.2.1 Theoretische Grundlagen	23
2.3.2.1.1 Der 1:1-Komplex	23
2.3.2.1.2 Der 2:1-Komplex	26
2.3.2.2 Ausführung	27
2.3.3 Freie Enthalpie, Reaktionswärme und Entropie	28
2.3.4 Berechnung der komplexierten Anteile	29
2.4 Peeling-off der Auswaschkurven	30
3 VORVERSUCHE	
3.1 Ergebnisse und Diskussion	33
3.1.1 Kalluskulturen	33
3.1.1.1 Theobromin und Coffein	34
3.1.1.2 Chlorophyll	36
3.2 Suspensionskulturen	37

4 HAUPTVERSUCHE

4.1 Komplexierung der Purinalkaloide	39
4.1.1 Komplexierungskonstanten und Extinktionskoeffizienten	40
4.1.1.1 Der Coffein-CGA-Komplex	40
4.1.1.2 Der Theobromin-CGA-Komplex	44
4.1.1.3 Der Paraxanthin-CGA-Komplex	45
4.1.1.4 Der Theophyllin-CGA-Komplex	46
4.1.1.5 Der Theacrin-CGA-Komplex	47
4.1.2 Diskussion	48
4.1.2.1 Das Problem der Löslichkeit	50
4.1.2.2 Die temperaturabhängige Komplexierungskonstante	51
4.1.2.3 Der Einfluss des pH auf die Komplexreaktion	53
4.2 Auswaschversuche mit Blattscheiben	54
4.2.1 Chlorogensäure in Kaffeeblättern	55
4.2.2 Einfluss der Blattscheibengröße und der Temperatur	59
4.2.3 Kurzzeitversuche (Kompartimentierungsstudien)	60
4.2.3.1 Kinetik der Auswaschkurven	60
4.2.3.2 Korrelation zwischen der Auswaschmenge und dem Coffein-CGA-Komplex	61
4.2.4 Langzeitversuche	63
4.2.4.1 Chlorogensäure in Blattscheiben und Medium	65
4.2.5 Diskussion	66
4.3 Blattscheiben in Kultur	73
4.3.1 Entwicklung der Biomasse	74
4.3.2 pH und der Osmolarität im Medium	76
4.3.3 Der Zuckerverbrauch	78
4.3.4 Die Purinalkaloidproduktion	81
4.3.5 Diskussion	85

5 ZUSAMMENFASSUNG 89

6 ANHANG

6.1 Appendix A	90
6.2 Appendix B	91
6.3 Appendix C	92
6.4 Appendix D	93
6.5 Appendix E	94
6.6 Appendix F	95
6.7 Appendix G	96

6 LITERATURVERZEICHNIS 98

ABKÜRZUNGEN

α	Irrtumswahrscheinlichkeit
AWL	Auswaschlösung
BS	Blattscheibe(n)
CGA	Chlorogensäure
CHCl_3	Chloroform
Co	Coffein = 1,3,7-Trimethylxanthin
CoA	Coenzym A
ϵ_{C}	Extinktionskoeffizient des Komplexes [$\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$]
FG	Frischgewicht
GA	Gesamtalkaloidgehalt
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl)]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
K_{c}	Komplexbildungskonstante
k_{r}	Diffusions- oder Geschwindigkeitskonstante [h^{-1}]
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure (Monohydrat)
$N_{\text{r},0}$	Initialwert des r-ten Kompartiments [μg]
NADPH	reduziertes Nicotinamadenindinucleotidphosphat
oS	S^+ -Medium ohne Saccharose
oW	S^+ -Medium ohne Wuchshormone
PA	Purinalkaloid(e)
Pa	Pascal
R	Gaskonstante: $8.314 \times 10^{-3} \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
rpm	rounds per minute
Tb	Theobromin = 3,7-Dimethylxanthin
TG	Trockengewicht
TGZ	prozentuale Trockengewichtszunahme
The	Theacrin = 1,3,7,9-Tetramethylharnsäure
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid
Tph	Theophyllin = 1,3-Dimethylxanthin
U/F	Umfang ($2\pi r$) / Fläche (πr^2)
UV	ultraviolettes Licht ($< 400 \text{ nm}$)

1. EINLEITUNG

Purinalkaloide kommen als sekundäre Pflanzenstoffe ausschliesslich in tropischen oder subtropischen Arten vor. Allein das Coffein wurde in mindestens 85 Arten nachgewiesen, wovon der Kaffeebaum (*Coffea arabica*), der Teestrauch (*Camellia sinensis*), der Matebaum (*Ilex paraguariensis*), der Kolabaum (*Cola nitida*) und die Guarana-Liane (*Paullinia cupana*) die prominentesten Vertreter sind. Theobromin, die biosynthetische Vorstufe des Coffeins kommt als Hauptalkaloid in den Samen des Kakaobaumes (*Theobroma cacao*) vor. Aufgrund der stimulierenden Wirkung werden diese beiden Purinalkaloide in Genussmitteln wie z.B. Kaffee und Tee weltweit von vielen Leuten geschätzt. Zwei weitere Methylxanthine, Theophyllin und Paraxanthin konnten nur in Spuren in grünen Bohnen von *Coffea arabica* und *Coffea robusta* nachgewiesen werden (KAPPELER und BAUMANN, 1985) und haben daher kaum eine Bedeutung für den Konsumenten. Ebenso macht der Theophyllingehalt in Teeblättern höchstens ein Tausendstel des Coffeingehaltes aus. Ein weiteres Purinalkaloid, das Theacrin, wurde erstmals 1937 von JOHNSON in kristalliner Form, herrührend aus Rückständen mehrerer Millionen Pfund Tee, gesammelt. Seine Mitteilung fand aber in der Fachwelt keine weitere Beachtung und geriet bald in Vergessenheit. Rund 40 Jahre später wurde Theacrin in Blättern von *Coffea liberica* als Hauptalkaloid und Abbauprodukt des Coffeins wiederentdeckt (WANNER et al. 1975, BAUMANN et al. 1976; PETERMANN et al. 1977; PETERMANN und BAUMANN, 1983).

Die Bedeutung der Purinalkaloide für die Pflanze wurde anfänglich in einer überaus effizienten Form der Stickstoffspeicherung gesehen. Der Stickstoffanteil am Molekulargewicht beträgt bei Theobromin und Coffein immerhin um die 30%, demgegenüber Speicherproteine nur 16% zu verbuchen haben. WEEVERS (1930) konnte an einigen Arten zeigen, dass während der Keimung vorzugsweise Coffein zur Neusynthese von Stickstoffverbindungen herangezogen wird. Für Kaffeebohnen trifft dieser Befund allerdings nicht zu: Während der Keimung wurde vielmehr ein Anstieg des Coffeingehaltes und eine drastische Abnahme der wasserlöslichen Proteine festgestellt (BAUMANN und GABRIEL, 1984). Dem Coffein wurde nun vermehrt die Bedeutung eines Schutzes vor Frass und/oder vor Pilzbefall beigemessen (FRISCHKNECHT et al. 1986). Zudem wurde in die Umgebung abgegebenes Coffein als Phytotoxin erkannt (RIZVI et al. 1981). Eine weitere, äusserst wichtige Aufgabe in der Pflanze ist die der Entgiftung. Da die Abfallstoffe nicht einfach in die Umgebung abgegeben werden können, müssen diese in eine geeignete Form (z.B. Purinalkaloide) umgewandelt und in ein "Abfallkompartiment", wie z.B. die Vakuole, eingelagert werden.

Chlorogensäure (CGA), ein Ester aus der Chinasäure und Kaffeesäure, ist im Pflanzenreich weit verbreitet und kann zudem in beträchtlichen Mengen auftreten. In Bohnen von *Coffea arabica* ist ein Gehalt von 55 - 65 mg/g TG durchaus üblich (CLIFFORD 1979). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist ein ähnlich hoher Gehalt in den Blättern nachweisbar. CGA kann in beiden Fällen als

Hauptkomponente einer Gruppe von Depsiden¹ betrachtet werden, die zur allgemeinen Verwirrung oftmals unter dem Trivialnamen "Chlorogensäuren" auftauchen. Bis heute sind 13 Depside bekannt, die einerseits aus einer Chinasäure und andererseits aus (1) einer Kaffeesäure, (2) aus 2 Kaffeesäuren, (3) einer Ferulasäure, (4) einer p-Cumarsäure oder (5) einer Kaffee- und einer Ferulasäure aufgebaut sind. In den Gruppen (1) bis (4) sind Positionsisiomere bekannt, die sich durch die 3 benachbarten und veresterbaren Hydroxylgruppen der Chinasäure ergeben (CLIFFORD 1979). Das bestuntersuchte Depsid ist die Kaffeeoyl-3'-Chinasäure, meist als Chlorogensäure (CGA) bezeichnet.

Es ist bekannt, dass die CGA-Synthese mit der Lichtinduktion der Phenylalanin-ammoniumlyase, dem Schlüsselenzym der Phenylpropan-Biosynthese, und durch die dabei anfallende Kaffeesäure gekoppelt ist (RHODES 1985). Verletzungen des Pflanzengewebes, Virus- und Pilzbefall (FARKAS und KIRALY, 1960), als auch Stickstoffmangel, UV-Strahlung und NaCl-induzierter Trockenstress (DEL MORAL 1972) können zu einer vermehrten CGA-Bildung beitragen. Eine weitere Bedeutung erlangt CGA als äusserst reaktives Substrat der Polyphenoloxidasen (SONDHEIMER 1964; VAMOS-VIGYAZO 1981), die für die Bräunungsreaktionen in absterbenden Pflanzenteilen und Gewebekulturen verantwortlich gemacht werden müssen.

Ein Zusammenhang zwischen Purinalkaloiden und CGA wurde erstmals von GORTER im Jahre 1907 hergestellt, als es ihm gelang aus 30 kg rohem Liberia-Kaffee "Chlorogensaures Kalicoffein" als kristallinen 1:1-Komplex zu isolieren. GORTER konnte ebenfalls zeigen, dass trockenes Chloroform nur sehr kleine Mengen des komplexierten Coffeins zu lösen vermag. Um 1940 konnte die tierphysiologische Relevanz des Komplexes demonstriert werden: Die Gabe von CGA erhöhte die toxische Coffeindosis bei Hasen und verminderte die Bewegung coffeinstimulierter Froschschenkel. SONDHEIMER et al. (1961) bestimmten die Komplexierungskonstante und untersuchten die Stabilität des Komplexes unter verschiedenen pH-Bedingungen. Mittels NMR-Studien konnten HORMAN und VIANI (1971, 1972) nachweisen, dass Coffein und CGA durch ein hydrophob wirkendes π -Elektronensystem komplexiert werden.

Der Coffein-CGA-Komplex wurde in der vorliegenden Arbeit Gegenstand weiterer Untersuchungen, als einerseits in Kalluskulturen eine zwischen Gewebe und Festmedium auftretende Ungleichverteilung des Coffeins festgestellt wurde, die auch nach monatelanger Kultivation aufrecht erhalten blieb (FRISCHKNECHT et al. 1977a). Andererseits konnte PFRUNDER (1979; PFRUNDER et al. 1980) in Kompartimentierungsstudien zeigen, dass

¹ Depside sind Ester einer aromatischen Hydroxysäure (z.B. Kaffeesäure) mit einem weiteren Molekül der gleichen oder einer anderen Hydroxysäure (Chinasäure). Eine dritte aromatische Hydroxysäure (z.B. Ferulasäure) kann hinzukommen.

aus Blattscheiben von *Coffea arabica* nur 50-70% des Coffeins ins Aussenmedium abgegeben werden. Diese Phänomene schienen umso erstaunlicher, da in Suspensionskulturen von *Coffea arabica* zwischen Zellaggregaten und Flüssigmedium innerhalb weniger Stunden ein Ausgleich der Coffeinkonzentrationen auftritt (FRISCHKNECHT und BAUMANN, 1980).

In einem Teil dieser Arbeit wird die Existenz des Coffein-CGA-Komplexes erstmals *in situ* an Blattscheiben von *Coffea arabica* untersucht. Vorausgehend wurde die Gleichgewichtskonstante des Komplexes spektrophotometrisch bestimmt. Um weitere Informationen über die Komplexbildungseigenschaften der Purinalkaloide zu erhalten, wurde die physikalisch-chemische Untersuchung auf die Dimethylxanthine Theobromin, Theophyllin, Paraxanthin und auf die Tetramethylharnsäure Theacrin ausgedehnt. Nachdem die Problematik der Coffeinkomplexierung erkannt war, interessierte das Langzeitverhalten der Blattscheiben unter sterilen Bedingungen in Bezug auf ihr Potential, Coffein zu produzieren und ins Medium abzugeben. Generell ging es um die biotechnologisch relevante Frage, ob Gewebeverbände aus differenzierten Zellen (wie z.B. Blattscheiben und autotrophe Kalluskulturen) geeignet sind, Sekundärstoffe von pharmazeutischem Interesse in Mengen zu produzieren, die mit den bis anhin verwendeten Zellsuspensionen nicht erreicht werden.



2. MATERIAL und METHODEN

2.1 Pflanzenmaterial

Sämtliches Pflanzenmaterial, sei es für primäre Kalluskulturen, Suspensionskulturen, oder aber für Versuche mit Blattscheiben, stammte von *Coffea arabica* L. var. Bourbon vermelho und Caturra. Das Alter der Pflanzen betrug $\frac{1}{2}$ bis $2\frac{1}{2}$ Jahre. Da in früheren Arbeiten nicht nur die Bedeutung des physiologischen Blattalters (FRISCHKNECHT 1980), sondern auch der Einfluss der jahreszeitlichen Temperatur- und Lichtschwankungen (BÖSCH 1985) auf die Coffeinbiosynthese erkannt wurde, erwies sich die Kultivation unter kontrollierten Bedingungen als die Methode der Wahl. Aus diesem Grunde wurden die Pflanzen mindestens 6 Monate vor Versuchsbeginn aus dem Gewächshaus (25° - 28°C , 55 - 85% Luftfeuchtigkeit) in eine licht-, temperatur- und luftfeuchtigkeitregulierte Klimakammer (Phytotron) gebracht. Die Düngung der Pflanzen erfolgte 1mal wöchentlich mit 0.5% Wuxal (NPK-Verhältnis 10.10.7,5; Maag, Dielsdorf, Schweiz).

2.1.1 Klimakammern und Konstantraum

Im Phytotron wurde für die Versuchspflanzen ein Klima simuliert, wie es in den kaffeeanbauenden, ostafrikanischen Ländern (z.B. Hochlandklima von Tansania) die Regel ist. Die optimale Tag- und Nachttemperatur wurde in Anlehnung an die Wachstumsversuche von WENT (1957) gewählt:

Tag: Dauer: 12 h; Temperatur: 24°C ; Taupunkttemperatur: 20.5°C ; Luftfeuchtigkeit: 80%; Lichtstufe 3: Vollicht ($200 - 500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ photo-synthetisch aktive Strahlung)

Nacht: Dauer: 10 h; Temperatur: 18°C ; Taupunkttemperatur: 16.0°C ; Luftfeuchtigkeit: 88%; Lichtstufe 0: dunkel.

Zwischenphase: Jeweils eine 1 Stunde zwischen Tag/Nacht-Wechsel über die Lichtstufen 1 und 2. Während dieser Zeit werden Temperatur und Taupunkttemperatur kontinuierlich und linear an die Tag/Nacht-Werte angeglichen.

Für die primären Kalluskulturen, Suspensions- und Blattscheibenkulturen wurde in einer weiteren Phytotronkammer ein Licht/Dunkel-Rhythmus (11 h / 11 h) bei konstanter Lufttemperatur (27°C) und konstanter Taupunkttemperatur (15.5°C , ergibt 50% Luftfeuchtigkeit) gefahren. Die Dämmerung dauerte jeweils 1 h. Bei Vollicht betrug die Bestrahlungsstärke für die Kulturen etwa $400 - 850 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit bedeutet die Angabe "im Licht", dass die oben beschriebenen Bedingungen zutreffen, während mit "im Dunkeln" Dauerdunkel gemeint ist, wobei die übrigen Parameter unverändert blieben.

2.1.2 Gewebekulturen

2.1.2.1 Medien

Fest- und Flüssigmedien enthalten in allen Versuchen und Ansätzen als Basis die käufliche Zusammensetzung gemäss MURASHIGE and SKOOG (1962; Flow Laboratories, Irvine, U.K.; 4.71 g/l) und zusätzliches Thiamin (0.9 g/l). Wuchshormone, Saccharose, Cystein, weitere Salze, Phytagar (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA), pH und Medienvolumen wurden wie folgt gehandhabt:

- Kalluskulturen auf Festmedium:

S⁺-Medium: 2,4-D: 1.0 mg/l; Kinetin: 0.2 mg/l

S-Medium: 2,4-D: 0.1 mg/l; Kinetin: 0.1 mg/l

In beiden Medien wurden ferner Cystein (10 mg/l), Saccharose (30 g/l) und 0.8% Phytagar zugegeben. Der pH wurde mit KOH auf 5.7 eingestellt. Jedes Kochglas (2.5 cm x 11 cm) war mit 15 ml Festmedium gefüllt.

- Suspensionskulturen:

S⁺-Medium ohne Phytagar (30 - 40 ml/Ansatz in 100 ml Erlenmeyer-Kolben)

- Blattscheiben in Flüssigmedium:

S⁺-Medium ist das Ausgangsmedium, das verwendet wurde, um einen direkten Vergleich mit den Suspensionskulturen zu gewährleisten. Weitere experimentell erprobte Modifikationen des *S⁺-Mediums* sind: *oS-Medium*: ohne Saccharose, *oW-Medium*: ohne Wuchshormone, *KCl-Medium*: plus 50 mM KCl, *NaCl-Medium*: plus 50 mM NaCl, *pH3.5-Medium*: 50 mM Citronensäure Monohydrat ($pK_{a1} = 3.06$) eingestellt mit TMAH (Tetramethylammoniumhydroxid x 5 H₂O; Calbiochem, La Jolla, CA, USA), *pH5.5-Medium*: 50 mM MES (2-Morpholinoethansulfonsäure, $pK_a = 6.15$; Sigma, St. Louis, MO, USA) eingestellt auf pH 5.5 mit TMAH, *pH7.5-Medium*: 50 mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, $pK_a = 7.55$; ULTROL[®] Buffers, Calbiochem) mit TMAH auf pH 5.5 eingestellt.

Die Medien "*pH3.5*", "*pH5.5*" und "*pH7.5*" wurden sterilfiltriert. Alle übrigen Medien wurden bei 120°C während 20 min autoklaviert.

2.1.2.2 Steriltechnik

Sämtliche in den folgenden Abschnitten beschriebenen Vorgänge wurden unter sterilen Bedingungen (Steril Bench mit laminarem Luftstrom) ausgeführt. Das frisch geerntete Pflanzenmaterial - Internodien oder ganze Blätter - wurde zur Chemosterilisation für jeweils 15 bis 20 min in einer gesättigten Ca(OCl)₂-Lösung belassen, die zur besseren Oberflächenbenetzung 2 Tropfen Triton X-100 (Octylphenoxypolyethoxiethanol, Sigma) enthielt. Das Pflanzenmaterial wurde daraufhin 2- bis 3mal in destilliertem Wasser (Waschstrasse) gewaschen. Die *Internodien* wurden anschliessend in einer 0.4%igen Cysteinlösung (Oxidationsschutz) zugeschnitten und auf das Festmedium gebracht. Um

eine mögliche Wirkung des Cysteins auf das physiologische Geschehen weitgehend zu unterbinden, wurde für die *Blattscheibenversuche* eine 10fach geringere Konzentration verwendet. Anfänglich wurde dabei so vorgegangen, dass die *Blattscheiben* mit einem sterilen Korkbohrer ($\varnothing$ 1 cm) aus Blättern ausgestanzt wurden, die sich in einer Cysteinlösung befanden. Sehr bald zeigte sich, dass die geringe CysteinKonzentration keinen hinreichenden Oxidationsschutz bot, so dass auf die Cysteinlösung verzichtet wurde.

Für einen Verzicht sprach auch der Umstand, dass 5 - 10% des Gesamtcoffeins und 1 - 2% der Chlorogensäure während des Ausstanzens aus den Blattscheiben austraten und somit für die Erstellung der Gesamtbilanz eines jeden Ansatzes verloren waren.

Die ausgestanzten Blattscheiben der Intercostalfelder wurden in ein durch Wägen bestimmtes Mediumvolumen - meist um 30 ml - gegeben. Die Erlenmeyerkolben (100 ml) wurden mit einer Aluminiumfolie verschlossen und zur Infiltration der Blattscheiben in einen Exsikkator gestellt. Ein Sterilfilter (0.2 μ m; Millex-FG, Millipore, Bedford, MA, USA), befestigt an der Ein-/Auslassöffnung des Exsikkators, bot Schutz vor Kontamination während der Infiltration, die nach mehrmaliger Druckverminderung auf 25'000 Pa vollständig war. Wie sich bald zeigte, war dieses schonende Vorgehen nötig um die Oxidationsvorgänge und die kurz darauf einsetzende Nekrose im Zentrum der Blattscheiben zu verhindern.

2.1.2.2.1 Kultivationsbedingungen

Über eine Dauer von 49 Tagen wurden die *Kalluskulturen* unter den folgenden Bedingungen (je 10 Ansätze) kultiviert:

- S⁺-Medium, im Dunkeln
- S⁺-Medium, im Licht
- S-Medium, im Dunkeln
- S-Medium, im Licht

Die Kalli wurden während der ganzen Kultivationsdauer auf dem gleichen Medium belassen. An deren Ende erfolgte die Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts und des Chlorophyllgehaltes. Theobromin und Coffein wurden sowohl im Kallus als auch im Medium quantifiziert.

Suspensionskulturen wurden permanent auf einem Rundschtüttler (120 rpm) oder auf einem Reziproschtüttler (95 rpm) bewegt, um eine optimale Sauerstoffversorgung sicherzustellen. Die Subkultivation erfolgte, falls nicht anders vermerkt, in 14tägigem Rhythmus.

Blattscheibenkulturen wurden bis zu 26 Tagen im selben Medium belassen und auf einem Rundschtüttler (120 rpm) bewegt.

2.1.2.2.2 Probeentnahme

Die Entnahme von Mediumproben aus Suspensions- und Blattscheibenkulturen erfolgte mittels steriler Plastikspritze (1 ml; PLASTIPAK[®], Becton Dickinson, Dublin, Irland). Bei den *Blattscheibenkulturen* wurde das entnommene Volumen mit Hilfe der Spritzenskaliierung ermittelt und jeweils vom ursprünglichen Mediumvolumen subtrahiert. Da über eine Kulturdauer von 26 Tagen jeden dritten Tag eine Mediumentnahme erfolgte, wurde sowohl die stetige Mediumabnahme, als auch die dadurch erfolgte "Abzweigung" von Komponenten in allen folgenden Bestimmungen, bei denen Absolutwerte (wie z.B. Zuckerverbrauch, Coffeinbildung) in die Berechnung einfließen, mitberücksichtigt.

2.1.3 Kurzzeit-Auswaschversuche mit Blattscheiben

Bei Auswaschversuchen über eine Zeitspanne von 7,5, bzw. 21,5 Stunden in destilliertem Wasser erübrigte sich eine sterile Arbeitsweise. Für die 7,5stündigen Versuche wurden 7 BS (Ø 1,8 cm; U/F = 2,23) und 10 BS (Ø 1,5 cm; U/F = 2,67), die zuvor mit Wasser infiltriert worden waren, in je ein Auswaschgefäß (Abb. 1a) gegeben. In allen Ansätzen betrug die Gesamtfläche der BS 17,8 cm². Das Material der parallel geführten Ansätze wurde hierfür aus dem gleichem Blatt ausgestanzt.

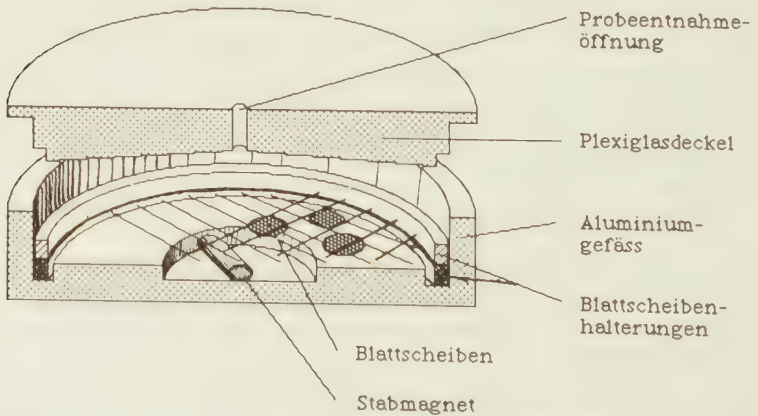


Abbildung 1a: Auswaschgefäß (modifiziert nach PFRUNDER et al. 1980)

Die Auswaschgefäße samt Inhalt wurden mittels eines Wasserbades auf die gewünschte Temperatur ($\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) eingestellt.

Die 21.5stündigen Auswaschversuche wurden mit 16 BS ($\varnothing$ 1 cm; U/F = 4.00) ausgeführt. Bevor sie in das Auswaschgefäß transferiert wurden, bestimmte man deren Frischgewicht und infiltrierte sie in Wasser bekannten Volumens. Die Analyse der Infiltrationslösung gab Aufschluss über den Verlust des in den BS befindlichen Coffeins und der Chlorogensäure. Die erste Probeentnahme erfolgte, sobald sich die BS im Auswaschgefäß befanden ($t = 0$), gefolgt von weiteren im 30-Minuten-Abstand während 7.5 Stunden. Die letzte Probe wurde kurz vor Beendigung des Experiments, nach 21.5 Stunden entnommen. Der in den BS verbliebene Coffeinanteil wurde daraufhin quantifiziert. Das nach dem Ausstanzen überschüssige, intercostale Blattmaterial wurde zur Bestimmung des CGA-Gehaltes herangezogen.

2.2 Analytik

Für die Theobromin-, Coffein-, Chlorogensäure- und Zuckerbestimmung wurde das Aliquot, sei es direkt aus dem Flüssigmedium oder aus einem gereinigten Extrakt, mit einem Filter (0.2 μ m; ACRO LC13, Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, MI, USA) von Partikeln befreit. Konnte die Analyse nicht innert Tagesfrist durchgeführt werden, wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1 Frisch- und Trockengewicht

Die Frischgewichtsbestimmung von *Kalluskulturen* erfolgte am Ende der Kultivationsdauer, indem der Agar bestmöglich entfernt und der ganze Kallus gewogen wurde. Für die *Blattscheibenkulturen* wurde zu Beginn des Experiments Blattmaterial (ohne Mittelrippe) der einzelnen Ansätze gewogen. Erfolgte die Frischgewichtsbestimmung nach einer gewissen Kulturdauer, so wurden die geernteten Blattscheiben zwischen Linsoft-Papier vom anhaftenden Medium befreit und anschliessend gewogen.

Für die Trockengewichtsbestimmung wurde das Pflanzenmaterial für 2 bis 3 Tage bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

2.2.2 Chlorophyllbestimmung

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in 7 Wochen alten Kalli wurde die Methode nach ARNON (1949) leicht modifiziert: Kallusmaterial mit einem Frischgewicht von 0.3 - 0.9 g wurde in einem Prep-Set® Behälter (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) mittels einer Stahlkugel in 7 ml 80%igem Aceton durch kräftiges Schütteln aufgeschlossen. Indem der Prep-Set® Einschub mit eingesetztem Glasfaserfilter in den Behälter gestossen wurde, konnte die chlorophyllhaltige, acetonische Lösung von den Zell- und Geweberückständen abgetrennt werden (Abb. 1b). Die Absorptionen bei den Maxima von Chlorophyll a und b (663 nm, bzw. 645 nm) wurden anschliessend im Spektrophotometer gegen eine 80%ige Acetonlösung (Referenz) gemessen. Ein PC berechnete den Gesamtchlorophyllgehalt (a+b)

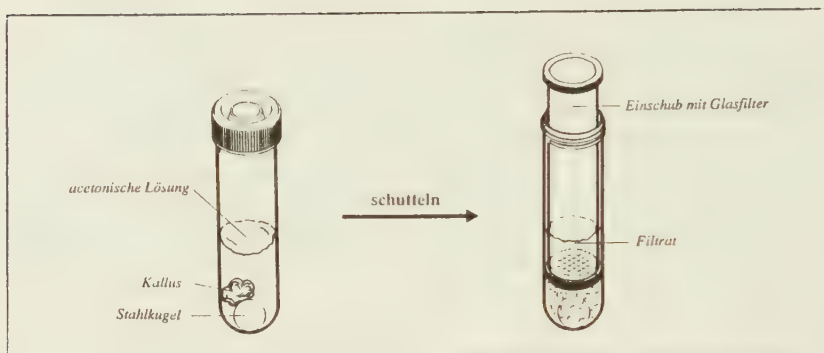


Abbildung 1b: Chlorophyllextraktion mit dem Prep-Set®

in mg/ml nach folgender Formel:

$$\text{Chl a+b} = (E_{645} \times 0.0202 + E_{663} \times 0.00802) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Auf eine Zugabe von NH_3 (0.05 M) zur Acetonlösung wurde verzichtet, da die Extrakte nicht sauer waren.

2.2.3 Theobromin- und Coffeinbestimmung

Grundsätzlich können drei Ausgangsmaterialien für die Alkaloidbestimmung unterschieden werden:

- pflanzliches Gewebe (Blätter, Kalli, Zellaggregate)
- Festmedium
- Flüssigmedium

Für die beiden erstgenannten Analyseobjekte war eine Extrakterstellung (modifiziert nach FRISCHKNECHT et al., 1977; FRISCHKNECHT und BAUMANN, 1980) unerlässlich.

Pflanzengewebe wurden 2 bis 3 Tage bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, bevor die Analyse erfolgte. Anzuführen ist an dieser Stelle, dass durch den Trocknungsvorgang keine Änderungen in Bezug auf den Theobromin- und Coffeingehalt festgestellt wurden. Das Material wurde während $\frac{1}{2}$ bis 1 h in einem entsprechenden Volumen einer 0.1, 0.025 oder 0.0125 N H_2SO_4 -Lösung bei 95°C gekocht. Dabei fand die Grundregel Beachtung, dass für 100 mg getrocknetes Pflanzenmaterial $100 \mu\text{mol H}^+$ vorhanden sein müssen. Das verdunstete Wasser wurde nach Abkühlen des Extraktes ersetzt und das an den Reagenzglaswänden haftende Kondenswasser hinunterzentrifugiert. Ein Aliquot von 1

oder 0.5 ml wurde auf eine mit weitporigem Kieselgur gefüllte Säule (Extrelut[®] 1, resp. mit Extrelut[®] gefüllte Pasteurpipette, Merck, Darmstadt, BRD) aufgetragen. Nach dem Einziehen des applizierten Extraktes wurden die Purinalkaloide mit CHCl_3 von der Säule eluiert (4faches Säulenvolumen). Das Eluat wurde im Wasserbad bei 70°C eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 oder 0.5 ml 30%igem MeOH, oder aber in destilliertem Wasser aufgenommen (Ultraschall).

Den *Festmedien* entzog man bei 80°C solange Wasser, bis nur noch ein äusserst zäher Rückstand vorhanden war. Unter Zugabe von 7 ml 0.1 N H_2SO_4 wurde das Gemisch während $\frac{1}{2}$ h gekocht. Der gesamte Extrakt wurde in einen Eichkolben überführt und mit destilliertem Wasser auf 10 ml ergänzt. Ein Aliquot (1 ml) der gutdurchmischten Lösung wurde auf eine Extrelut[®] 1-Fertigsäule gebracht. Das weitere Vorgehen entsprach der oben erwähnten Methode.

Die Nachweisgrenze der HPLC-Analyse betrug für Coffein ($\epsilon_{271} = 9530$, in H_2O dest.) 10 ppm TG, resp. $1\text{ }\mu\text{g}/15\text{ ml}$ Festmedium oder $10\text{ ng}/\text{Injektionsvolumen}$. Für Theobromin ($\epsilon_{271} = 9700$, in H_2O dest.) lag die Nachweisgrenze im selben Bereich.

2.2.4 Chlorogensäurebestimmung

Getrocknetes Pflanzenmaterial (20 - 100 mg), das nach dem Ausstanzen der Blattscheiben zurückblieb und aus dem intercostalen Blattbereich stammte, wurde zur Bestimmung der *Anfangswerte* verwendet. Nach Abschluss eines Versuches wurde ein Aliquot der getrockneten Blattscheiben zur Ermittlung des *Endwertes* aufgearbeitet.

Zu diesem Zweck wurde das Material während 15 min in 4 ml destilliertem Wasser gekocht. Nach Ergänzen des verdunsteten Wassers erfolgte die Analyse mittels HPLC (siehe 2.2.6). Ein Aliquot des Mediums wurde ohne Aufarbeitung direkt mit der HPLC analysiert.

2.2.5 Glucose-, Fructose- und Saccharosebestimmung

Die Analyse der Medien erfolgte mit Hilfe eines Enzym-Tests (Boehringer, Mannheim, BRD), dessen Prinzip darin bestand, den Glucosegehalt vor und nach der enzymatischen Hydrolyse von Saccharose zu bestimmen. Fructose wurde in Anschluss an die Glucosebestimmung gemessen. Das durch die enzymatischen Reaktionen gebildete NADPH wurde jeweils als stöchiometrisches Äquivalent für Glucose, resp. Fructose bei 340 nm spektrophotometrisch ermittelt. Die Proben wurden verdünnt, so dass zur Bestimmung eine optimale Zuckerkonzentration zwischen 0.05 und 0.8 g/l erhalten wurde.

Da bei der Zuckerbestimmung die Menge der verbrauchten Saccharose interessierte, wurden die gemessenen Saccharose-, Glucose- und Fructosekonzentrationen ([Sacch], [Glu] und [Fru]) in eine theoretische Saccharosekonzentration (= Totalzucker im Medium) umgerechnet:

$$[Totalzucker] = [Sacch] + \frac{[Glu] + [Fru]}{2 \cdot MG_{Glu/Fru}} \cdot MG_{Sacch}$$

$MG_{Glu/Fru}$ = Molekulargewicht von Glucose oder Fructose (= 180.16 g/mol)

MG_{Sacch} = Molekulargewicht von Saccharose (= 342.30 g/mol)

2.2.6 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Zur Quantifizierung der Purinalkaloide Theobromin und Coffein und des Depsids Chlorogensäure standen 2 HPLC-Anlagen (Waters Associates, Milford, MA, USA und Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) zur Verfügung. Die Anlage von Waters bestand aus dem System Controller, Data Module, Wisp 710B, UV/VIS-Detektor und 2 Pumpen 6000A. Die HPLC von Hewlett-Packard setzte sich aus dem Liquid Chromatograph HP 1090, inkl. Dioden Array Detektor und Rechner 85B mit Winchester Drive zusammen. Die chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Chromatographische Spezifikationen zur Analytik der Purinalkaloide und Chlorogensäure.
W = HPLC von Waters, HP = HPLC von Hewlett-Packard.

	Bestimmung von	
	Theobromin/Coffein	Chlorogensäure
Vor- und Hauptsäule	W: Nucleosil C-18, 10 µm, 30 x 4 mm; Nucleosil C-18, 5 µm, 100 x 4 mm ^a W und HP: LiChrosorb® RP-18, 7 µm, 25 x 4 mm; Superspher RP-18, 4 µm, 125 x 4 mm ^b	HP: LiChrosorb® RP-18, 7 µm, 25 x 4 mm; Superspher RP-18, 4 µm, 125 x 4 mm ^b
Fluss [ml/min]	W: 1.3; HP: 1.1-1.3	HP: 1.1
Laufmittel	W und HP: 25% MeOH	HP: 25% MeOH, 75% dest. Wasser (0.025 M tri-K-Citrat, pH 2.5) ^c
Integration bei λ [nm]	W und HP: 271	HP: 325
Referenzsubstanzen	sublimiertes Coffein; Theobromin, reinst ^d	Chlorogensäure [3-O-(3,4-Dihydroxy- cinnamoyl)-D-chinasäure] ^e

^a Knauer, Bad Homburg, BRD

^b Merck, Darmstadt, BRD

^c modifiziert nach VAN DER STEGEN und VAN DUIJN (1980)

^d Dr. Bender & Dr. Hobcin, Zürich, Schweiz

^e Fluka AG, Buchs, Schweiz

Die Überprüfung der Medien und Extrakte auf "seltene" Purinalkaloide hin erfolgten mit einem speziell entwickelten Gradientenprogramm (modifiziert nach KAPPELER und

BAUMANN, 1985). Die Spektren interessierender "Peaks" wurden mit Hilfe des Dioden Array aufgezeichnet und allenfalls unter Zuhilfenahme der Retentionszeiten, resp. der k' -Werte und der Übergipfelungstechnik identifiziert. Die Reinheit eines "Peaks" wurde durch die Quotientenbildung zweier parallel aufgezeichneter Absorptionssignale unterschiedlicher Messwellenlänge überwacht.

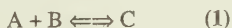
2.3 Untersuchung von Komplexreaktionen

Grundsätzlich können zwei Methoden zur Bestimmung der *Komplexbildungskonstanten* K_c zweier Komponenten A und B verwendet werden. Während die sogenannte *Verteilungsmethode* (partition method) für eine schnelle Abschätzung der Komplexfähigkeit zweier Komponenten A und B und für eine Bestimmung des K_c genügt, liefert die *spektrophotometrische* Untersuchung ausser einem gemittelten K_c -Wert auch Aussagen über die Art des Komplexes. Zudem ermöglicht diese Methode mit Hilfe eines thermostatisierbaren Spektrophotometers die Bestimmung von K_c in Abhängigkeit der Temperatur. Diese Vorteile werden durch einen Mehraufwand an Zeit und Arbeit erkaufte, da zur Untersuchung eines Komplexes mehrere Ansätze ausgewertet werden müssen. Die theoretischen Grundlagen beider Methoden werden in den folgenden Kapiteln dargelegt.

2.3.1 Die Verteilungsmethode

Voraussetzung für diese Bestimmungsmethode ist ein 2-Phasen-System, bestehend aus einer wässrigen und einer organischen, lipophilen Phase (z.B. CHCl_3). Weiter müssen sowohl die Komponenten A und B als auch der aus ihnen gebildete Komplex C in der wässrigen Phase löslich sein. Hingegen darf sich in der organischen Phase nur eine Komponente lösen, die wir als B bezeichnen, welches für ein entsprechendes Purinalkaloid (PA) stehen soll. Unter standardisierten Bedingungen wird nun die Menge des zu untersuchenden PA in der organischen Phase bestimmt, und zwar in je einem Ansatz *ohne* und *mit* Komplexor A. Das Verhältnis der Mengen "PA ohne Komplexor/PA mit Komplexor" in der organischen Phase wird als *Extraktionskoeffizient* bezeichnet. Ein Wert von 1 bedeutet keine, ein solcher unter 1 vorhandene Komplexbildung. Mit dieser Methode erhält man auf einfache und elegante Weise eine Aussage über die *relative Komplexbildungsfähigkeit* ohne Annahmen über das Komplexbildungsverhältnis (A:B) und die Konzentration der in der wässrigen Phase vorhandenen Komplexe machen zu müssen.

Ist bekannt, dass ausschliesslich ein 1:1-Komplex gebildet wird, kann mittels der folgenden Gleichungen die Gleichgewichtskonstante K_c der Komplexreaktion berechnet werden (HIGUCHI und ZUCK, 1952). Wie wir wissen, gilt



und

$$K_c = \frac{[C]}{([A]_0 - [C]) \cdot ([B]_{Wasser} - [C])} \quad (2)$$

$[A]_0$ = Anfangskonzentration von A

$[B]_{Wasser}$ = Konzentration des komplexierten und unkomplexierten B in wässriger Phase

$[C]$ = Konzentration des Komplexes

Weiter soll für den Verteilungskoeffizienten k gelten:

$$k = \frac{[B]_{Wasser, f}}{[B]_{org}} \quad (3)$$

$[B]_{Wasser, f}$ = Konzentration des freien, unkomplexierten B in wässriger Phase

$[B]_{org}$ = Konzentration von B in der organischen Phase

Unter Verwendung von (3) wird

$$\begin{aligned} [C] &= [B]_{Wasser} - [B]_{Wasser, f} \\ &= [B]_{Wasser} - k \cdot [B]_{org} \end{aligned} \quad (4)$$

Durch Einsetzen von (4) in (2) erhält man

$$K_c = \frac{[B]_{Wasser} - k \cdot [B]_{org}}{([A]_0 - [B]_{Wasser} + k \cdot [B]_{org}) \cdot k \cdot [B]_{org}} \quad (5)$$

wobei gilt

$$[B]_{Wasser} = [B]_0 - [B]_{org} \quad (6)$$

Wird nun (6) in Gleichung (5) eingesetzt, so erhält man nach Vereinfachung für K_c den folgenden Ausdruck:

$$K_c = \frac{[B]_0 - [B]_{org} \cdot (1 + k)}{([A]_0 - [B]_0 + [B]_{org} \cdot (1 + k)) \cdot k \cdot [B]_{org}} \quad (7)$$

Wurde der Verteilungskoeffizient k für die Komponente B in einem vorgängigen Ansatz ohne Komplexor bestimmt und sind in einem zweiten Ansatz mit A und B deren Anfangskonzentrationen und die Menge von B in der organischen Phase bekannt, so kann mit Hilfe der Gleichung (7) die gesuchte Komplexbildungskonstante K_c ermittelt werden. An dieser Stelle sei betont, dass mittels der Verteilungsmethode nicht erkannt werden kann,

ob es sich bei der untersuchten Komplexbildung wirklich um einen 1:1-Komplex handelt.

Für eine brauchbare Messung ist es zudem unerlässlich, bei jeder neuen AB-Wahl sicherzustellen, dass weder A noch C in der lipophilen Phase erscheinen. Stimmen alle Voraussetzungen, ist eine Bestimmung von K_c schnell und einfach durchführbar.

2.3.2 Die spektrophotometrische Methode

2.3.2.1 Theoretische Grundlagen

Die theoretischen Grundlagen wurden ursprünglich für Komplexbildungsreaktionen zwischen einem Elektronen-Akzeptor (Lewis-Säure) und einem Elektronen-Donator (Lewis-Base) entwickelt. Es handelt sich hierbei um einen sogenannten *charge-transfer-Komplex*, bei dem im UV-Bereich eine Absorptionsbande auftritt, die weder im Spektrum des Donators, noch in demjenigen des Akzeptors vorhanden ist. Diese Bande kann elektronischen Übergängen ($> 200 \text{ nm}$: $\pi \rightarrow \pi^*$; $>> 200 \text{ nm}$: $n \rightarrow \pi^*$) direkt zugeordnet werden, was wiederum dem Übergang eines Elektrons vom Donator auf den Akzeptor entspricht. Das Auftreten dieser neuen, längerwelligen Absorptionsbande ist ein Phänomen, dass in der angelsächsischen Literatur als *bathochromic shift*² bezeichnet wird.

2.3.2.1.1 Der 1:1-Komplex

Unter der Annahme, dass es sich um einen 1:1-Komplex handelt, kann die Komplexreaktion (1) vorausgesetzt werden. Wir erhalten gemäss Massenwirkungsgesetz:

$$K_c = \frac{[C]}{([A]_0 - [C]) \cdot ([B]_0 - [C])} \quad (8)$$

$[A]_0$ = Anfangskonzentration von A (Chlorogensäure)

$[B]_0$ = Anfangskonzentration von B (Purinalkaloid)

$[C]$ = Konzentration des Komplexes bei Erreichen des Reaktionsgleichgewichts

Weiter soll angenommen werden, dass die Komponenten A und B in einem Konzentrationsbereich vorliegen, in dem das Lambert-Beer'sche Gesetz Gültigkeit hat. Die Absorption der Reaktion bei einer beliebigen Wellenlänge λ , gemessen in einer 1 cm Küvette, beträgt dann

$$A(\lambda) = \epsilon_A \cdot ([A]_0 - [C]) + \epsilon_B \cdot ([B]_0 - [C]) + \epsilon_C \cdot [C] \quad (9)$$

² bathochrom = farbvertiefend (Rotverschiebung, nach grösserem λ)

wobei ϵ_A , ϵ_B und ϵ_C die entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten der Komponenten A, B und C bedeuten. Durch Ausmultiplizieren und Vereinfachen erhält man:

$$A(\lambda) = A_{0,A} + A_{0,B} + [C] \cdot (\epsilon_C - \epsilon_A - \epsilon_B) \quad (10)$$

$A_{0,A} = \epsilon_A \cdot [A]_0$; Absorption der Anfangskonzentration A

$A_{0,B} = \epsilon_B \cdot [B]_0$; Absorption der Anfangskonzentration B

$$[C] = \frac{A(\lambda) - A_{0,A} - A_{0,B}}{\epsilon_C - \epsilon_A - \epsilon_B} \quad (11)$$

Wird nun Gleichung (8) zu (12) umgeformt, so dass

$$\frac{1}{K_c} = \left(\frac{[A]_0}{[C]} - 1 \right) \cdot ([B]_0 - [C]) \quad (12)$$

und wird (11) in (12) eingesetzt, so erhält man:

$$\frac{1}{K_c} = \left([A]_0 \cdot \frac{\epsilon_C - \epsilon_A - \epsilon_B}{A(\lambda) - A_{0,A} - A_{0,B}} - 1 \right) \cdot \left([B]_0 - \frac{A(\lambda) - A_{0,A} - A_{0,B}}{\epsilon_C - \epsilon_A - \epsilon_B} \right) \quad (13)$$

Sind die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_A und ϵ_B und die Absorptionen $A_{0,A}$ und $A_{0,B}$ bekannt, muss noch $A(\lambda)$ bei eingestelltem Gleichgewicht der Reaktion gemessen werden und man erhält eine Gleichung mit den zwei Unbekannten K_c^{-1} und ϵ_C , d.h. K_c^{-1} ist eine Funktion von ϵ_C . Da diese Gleichung nur mit Hilfe zweier Gleichungssysteme gelöst werden kann, muss ein zweiter Versuch mit anderen Anfangskonzentrationen $[A']_0$ und $[B']_0$ durchgeführt werden. Neben einer komplizierten, rechnerischen Lösung, gibt es das graphische Verfahren nach ROSE und DRAGO (1959) zur Auffindung von K_c^{-1} und ϵ_C .

Dabei werden verschiedene, zufallsmässig generierte Werte von ϵ_C in die Gleichung, die das erste Datentripel beinhaltet, eingesetzt um die dazugehörigen K_c^{-1} zu erhalten. Durch die Auftragung von K_c^{-1} vs. ϵ_C erhält man eine Kurve. Verfährt man mit einem weiteren Datentripel in gleicher Weise, findet man die gesuchte Lösung in Form des Schnittpunktes beider Kurven. Idealerweise schneiden sich die Kurven aller Datentripel in einem einzigen Punkt. Dieser Schnittpunkt repräsentiert den gesuchten K_c^{-1} - und ϵ_C -Wert. In der Praxis jedoch, werden die Kurvenpaare unterschiedliche Schnittpunkte besitzen, die innerhalb eines engbegrenzten Gebietes zu liegen kommen, falls die experimentellen Daten "gut" sind. Voraussetzung zur Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung ist, dass alle Schnittpunkte gleichgewichtet werden.

Eine Vereinfachung erfährt die Auswertung, wenn λ so gewählt werden kann, dass ϵ_C maximal wird und die Absorptionen von $A_{0,A}$ und $A_{0,B}$ vernachlässigbar klein werden. Aus Gleichung (13) wird dann

$$\frac{1}{K_c} = \frac{[A]_0 \cdot [B]_0}{A(\lambda)} \cdot \epsilon_C - [A]_0 - [B]_0 + \frac{A(\lambda)}{\epsilon_C} \quad (14)$$

Ist die Anfangskonzentration $[B]_0 \gg [A]_0$, so kann die Konzentration des Komplexes $[C] = A(\lambda)/\epsilon_C$ auch nur kleinere Werte als $[A]_0$ erreichen und wird somit, wie $[A]_0$ selbst, vernachlässigbar. Für diesen speziellen Fall gilt die Gleichung von BENESI-HILDEBRAND (1949):

$$\frac{1}{K_c} = \frac{[A]_0 \cdot [B]_0}{A(\lambda)} \cdot \epsilon_C - [B]_0 \quad (15)$$

Durch Umformen erhält man

$$[B]_0 = [A]_0 \cdot \epsilon_C \cdot b \cdot \left(\frac{[B]_0}{A(\lambda)} \right) - \frac{1}{K_c} \quad (16)$$

wobei zum allgemeingültigen Gebrauch der Gleichung noch b als Schichtdicke der Küvette (in cm) eingeführt wird. Trägt man aus verschiedenen experimentellen Ansätzen die Werte $[B]_0$ gegen $[B]_0/A(\lambda)$ auf und legt eine Gerade mit Hilfe der Methode der kleinsten quadratischen Abweichungen (Korrelationsgerade) durch die Punkteschar, kann K_c^{-1} aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse und ϵ_C aus der Steigung der Geraden ($[A]_0 \epsilon_C b$) ermittelt werden.

Nochmals sei betont, dass dieses Verfahren mit Gleichung (16) nur dann anwendbar ist, wenn die folgenden Voraussetzungen gegeben sind:

1. Einhaltung des Lambert-Beer'schen Gesetzes
2. 1:1-Komplex
3. Keine Absorptionen von A und B bei der Messwellenlänge λ
4. $[B]_0 \gg [A]_0$

Nur wenn $(A(\lambda)/\epsilon_C - [A]_0)$ nicht signifikant unterschiedlich von $[B]_0[C]/A \epsilon_C - [B]_0$ ist, kann die BENESI-HILDEBRAND-Gleichung angewendet werden, d.h. die erhaltene Differenz muss im Vergleich zum experimentellen Fehler insignifikant sein (DRAGO und ROSE, 1959).

Vergleichsweise wurde zur Auswertung der eigenen Datensätze sowohl das schnelle graphische Verfahren (= Verfahren I) mit Gleichung (16), als auch das aufwendige rechnerisch-graphische Verfahren (= Verfahren II) unter Verwendung von Gleichung (14) durchgeführt. Stellte sich bei Verfahren II heraus, dass einzelne, erhaltene "Geraden" - die korrekterweise als Kurven mit minimalster vernachlässigbarer Krümmung bezeichnet

werden müssten - bezüglich ihrer Schnittpunkte mit den restlichen "Geraden" grosse Abweichungen zeigten, wurden diese bei der Mittelwertbildung von K_c^{-1} und ϵ_C nicht berücksichtigt. Die graphische Darstellung dient sozusagen als Qualitätskontrolle, um zu entscheiden, welche Datensätze für die weitere Auswertung brauchbar sind. Die Schnittpunkte der verbleibenden "Geraden" wurden rechnerisch bestimmt, indem Gleichung (14) unter Verwendung zweier verschiedener Datensätze ($[A]_0$, $[B]_0$, $A(\lambda)$ und $[A']_0$, $[B']_0$, $A'(\lambda)$) sich selbst gleichgesetzt wird. In der quadratischen Gleichung für ϵ_C (17) wurde zudem vorausgesetzt, dass $[A]_0 = [A']_0$ (in unserem Fall CGA) ist.

$$\epsilon_C^2 \cdot \left[[A]_0 \cdot \left(\frac{[B']_0}{A'(\lambda)} - \frac{[B]_0}{A(\lambda)} \right) \right] + \epsilon_C \cdot \left[[B]_0 - [B']_0 \right] + \left[A'(\lambda) - A(\lambda) \right] = 0 \quad (17)$$

Eine der beiden Lösungen ist das gesuchte ϵ_C , das wiederum in Gleichung (14) eingesetzt wird, woraus der gesuchte K_c^{-1} -Wert, resp. K_c resultiert.

2.3.2.1.2 Der 2:1-Komplex

Unter der Annahme, dass ein 2:1-Komplex gebildet wird, lautet die Formulierung der chemischen Reaktion:



und

$$K_c = \frac{[C]}{([A]_0 - [C]) \cdot ([B]_0 - [C])^2} \quad (19)$$

Für die Erklärung der Symbole sei auf Kapitel 2.3.2.1.1 verwiesen. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass $[B]_0$ der halben (!) *tatsächlichen Konzentration* $[B]_{real}$ entspricht. Analog zur Herleitung der Gleichungen (9) und (11) erhält man (20) und (21):

$$A(\lambda) = \epsilon_A \cdot ([A]_0 - [C]) + 2 \cdot \epsilon_B \cdot ([B]_0 - [C]) + \epsilon_C \cdot [C] \quad (20)$$

$$[C] = \frac{A(\lambda) - A_{0,A} - 2 \cdot A_{0,B}}{\epsilon_C - \epsilon_A - 2 \cdot \epsilon_B} \quad (21)$$

Diese Gleichung wird nun entsprechend (12) umgeformt:

$$\frac{1}{K_c} = \left(\frac{[A]_0}{[C]} - 1 \right) \cdot ([B]_0 - [C])^2 \quad (22)$$

Durch Einsetzen von (21) in (22) erhält man analog zur Gleichung (13) einen Ausdruck der

vereinfacht werden kann, wenn angenommen wird, dass ϵ_C bei der Messwellenlänge λ maximal wird, während ϵ_A und ϵ_B , resp. $A_{0,A}$ und $A_{0,B}$ verschwindend klein werden:

$$\frac{1}{K_C} = \left(\frac{[A]_0 \cdot [B]_0}{A(\lambda)} \cdot \epsilon_C - [A]_0 - [B]_0 + \frac{A(\lambda)}{\epsilon_C} \right) \cdot \left([B]_0 - \frac{A(\lambda)}{\epsilon_C} \right) \quad (23)$$

Wie bei Verfahren II kann durch Einsetzen verschiedener ϵ_C für jedes Datentripel ($A(\lambda)$, $[A]_0$, $[B]_0$) eine Kurve konstruiert werden. Die Schnittpunkte mit den restlichen Kurven der gleichen Messreihe ergeben wiederum die gesuchten K_C - und ϵ_C -Werte. Da die Kurven einen recht komplizierten Verlauf aufweisen, erfolgte die Bestimmung der einzelnen Schnittpunkte rechnerisch, indem Gleichung (23) unter Verwendung zwei verschiedener Datensätze sich selbst gleichgesetzt wurde. Es resultiert daraus eine kubische Gleichung mit drei Lösungen für ϵ_C , wovon selbstverständlich nur eine Lösung die Richtige ist, die - wiederum in Gleichung (23) eingesetzt - das gesuchte K_C ergibt (= Verfahren III).

$$\epsilon_C^3 \cdot p + \epsilon_C^2 \cdot q + \epsilon_C \cdot r + v = 0 \quad (24)$$

$$p = \frac{[A]_0 \cdot [B]_0^2}{A(\lambda)} - \frac{[A']_0 \cdot [B']_0^2}{A'(\lambda)}$$

$$q = 2 \cdot [A']_0 \cdot [B']_0 + [B']_0^2 - 2 \cdot [A]_0 \cdot [B]_0 - [B]_0^2$$

$$r = A(\lambda) \cdot (2 \cdot [B]_0 + [A]_0) - A'(\lambda) \cdot (2 \cdot [B']_0 + [A']_0)$$

$$v = A'(\lambda)^2 - A(\lambda)^2$$

Die 3 Lösungen für ϵ_C wurden durch ein computerisiertes, iteratives Tangentennäherungsverfahren nach Newton bestimmt. Das Programm berechnet für einen beliebig vorgegebenen ϵ_C -Wert die Funktion $f(\epsilon_C)$, die der linken Seite von Gleichung (24) entspricht. Dann wird mit Hilfe der 1. Ableitung $f'(\epsilon_C)$ die Steigung an dieser Stelle berechnet. Die dazugehörige Tangente schneidet die ϵ_C -Achse in

$$\epsilon_{C, \text{neu}} = \epsilon_C - \frac{f(\epsilon_C)}{f'(\epsilon_C)} \quad (25)$$

$\epsilon_{C, \text{neu}}$ wird zu ϵ_C mit dem die ganze Prozedur wiederholt wird. Die Eingrenzung des ϵ_C -Wertes wird dann abgebrochen, wenn $f(\epsilon_C)$ vernachlässigbar klein ($< 1 \times 10^{-12}$), bzw. Null geworden ist.

2.3.2.2 Ausführung

Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K_C der Komplexreaktion zwischen den Purinalkaloiden (Coffein, Theobromin, Paraxanthin, Theophyllin und Theacrin) und CGA erfolgte bei 25°C mit einem thermostatisierbaren Spektrophotometer. Zu diesem Zweck wurde eine 0.2 mM Stammlösung von CGA in destilliertem Wasser zubereitet. Mit dieser

Lösung wurde anschliessend für jedes Purinalkaloid unter Berücksichtigung der Löslichkeitsprodukte eine Konzentrationsreihe hergestellt (Tab. 2).

Tabelle 2: Konzentrationsreihen der Purinalkaloide [mM] in CGA-Stammlösung (0.2 mM).

Ansatz	<i>Coffein</i> ^a	<i>Theobromin</i> ^b	<i>Theophyllin</i> ^c	<i>Paraxanthin</i> ^d	<i>Theacrin</i> ^{d,e}
1	5.00	1.429	5.00	7.69	1.43
2	10.00	1.666	10.00	8.33	1.67
3	20.00	1.818	12.50	9.10	2.00
4	25.00	2.00	14.29	10.00	2.50
5	33.33	2.22	16.66	11.10	3.33
6	50.00	2.50	20.00	12.50	4.29

^a wasserfrei, purum; Fluka AG, Buchs, Schweiz

^b reinst; Dr. Bender & Dr. Hobein, Zürich, Schweiz

^c rein; Dr. Bender & Dr. Hobein

^d purum; Fluka AG

^e 25 mg Theacrin wurden in 1 ml 0.1 N HCl gelöst und mit CGA-Lösung auf 25 ml aufgefüllt. Nun wurde 1 ml entnommen und durch 1 ml 0.1 N KOH ersetzt. Mit der 0.2 mM CGA-Lösung wurde gleich verfahren.

Mit einem UV/VIS-Spektrophotometer (Perkin-Elmer 551S) wurden für alle Ansätze Differenzspektren von 300 - 400 nm gefahren. Der PA-CGA-Komplex befand sich in der Probe- und die CGA-Lösung in der Referenzküvette. Das Absorptionsmaximum bei 354 nm wurde in Abhängigkeit der PA-Konzentration gemessen.

2.3.3 Freie Enthalpie, Reaktionswärme und Entropie

Ist die Gleichgewichtskonstante K_c einer Komplexreaktion bekannt, kann die *freie Enthalpie* ΔG_r^0 berechnet werden:

$$\Delta G_r^0 = -R \cdot T \cdot \ln K_c \quad (26)$$

ΔG_r^0 bezieht sich dabei ausschliesslich auf die Bildung der Produkte im Standardzustand (1 atm, 25°C) aus den Edukten ebenfalls im Standardzustand und auf einen vollständigen der Reaktionsgleichung entsprechenden Stoffumsatz (CHRISTEN 1977).

Die *Reaktionswärme* ΔH^0 wurde als konzentrations- und temperaturunabhängige Grösse mit Hilfe der Gleichung von van't Hoff, die zu

$$\ln \frac{K_c(T_2)}{K_c(T_1)} = -\frac{\Delta H^0}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)$$

bzw. zu

$$\Delta H^{\circ} = -\ln \frac{K_c(T_2)}{K_c(T_1)} \cdot R / \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (27)$$

umgeformt wurde, bestimmt. Zu diesem Zweck wurde mit der spektrophotometrischen Methode ein weiteres K_c bei $T_2 = 60^{\circ}\text{C}$ ermittelt.

Ist ΔH° und K_c bei 25°C bekannt, so lässt sich ebenfalls die *Entropie* ΔS° der Komplexreaktion berechnen. ΔS° kann ebenfalls wie ΔH° in dem uns interessierenden Temperaturbereich von 0 bis 60°C als unabhängige Grösse aufgefasst werden:

$$\Delta S^{\circ} = R \cdot \ln K_c + \frac{\Delta H^{\circ}}{T} \quad (28)$$

Bei bekanntem ΔH° und ΔS° lässt sich nun für jede Temperatur ($0^{\circ}\text{C} < T < 100^{\circ}\text{C}$) die dazugehörige Gleichgewichtskonstante K_c unter Verwendung der folgenden Gleichung errechnen:

$$\ln K_c = -\frac{\Delta H^{\circ}}{R \cdot T} + \frac{\Delta S^{\circ}}{R} \quad (29)$$

2.3.4 Berechnung der komplexierten Anteile

Sind die Konzentrationen $[A]_0$ und $[B]_0$ bekannt, kann unter Verwendung der Gleichgewichtskonstanten K_c die Konzentration des Komplexes C berechnet werden. $[C]$ geht als eine der beiden möglichen Lösungen einer quadratischen Gleichung hervor, die durch Umformen von Gleichung (8) (siehe 2.3.2.1.1) erhalten wurde:

$$[C]^2 \cdot K_c + [C] \cdot [-K_c \cdot ([A]_0 + [B]_0) - 1] + K_c \cdot [A]_0 \cdot [B]_0 = 0 \quad (30)$$

Handelt es sich um einen 2:1-Komplex (Theacrin:CGA), so kann $[C]$ mit einer kubischen Gleichung ermittelt werden, die aus Gleichung (19) (siehe 2.3.2.1.2) hergeleitet wurde:

$$[C]^3 \cdot (-K_c) + [C]^2 \cdot (K_c \cdot [A]_0 + 2 \cdot K_c \cdot [B]_0) - [C] \cdot (2 \cdot K_c \cdot [A]_0 \cdot [B]_0 + K_c \cdot [B]_0^2 + 1) + K_c \cdot [A]_0 \cdot [B]_0^2 = 0 \quad (31)$$

Die Lösung wird über das iterative Tangentennäherungsverfahren nach Newton ermittelt, wie dies für Gleichung (24) in Abschnitt 2.3.2.1.2 beschrieben wurde. Unbedingt zu beachten ist, dass die *tatsächliche Anfangskonzentration* $[B]_{real}$ der 2fachen (!) Konzentration $[B]_0$ entspricht.

Die Quotienten $[C]/[A]_0$ und $[C]/[B]_0$, multipliziert mit 100%, ergeben den prozentualen, komplexierten Anteil der ursprünglichen Konzentrationen $[A]_0$ und $[B]_0$, bzw. $[B]_{real}$.

Die Konzentrationen der Chlorogensäure ($[A]_0$) und des Purinalkaloids ($[B]_0$), resp. $[B]_{\text{real}}$ *in situ* können aus der Gesamtmenge einer Komponente, dividiert durch den Wasseranteil berechnet werden. Der Wasseranteil wird aus der Differenz zwischen FG und TG bestimmt. Ist der Gehalt (mg/g TG), das FG/TG-Verhältnis und das Molekulargewicht (MG; g/mol) bekannt, kann mit der folgenden Gleichung die Konzentration ($[S]$; mol/l) errechnet werden. $[S]$ steht für $[A]_0$, $[B]_0$ und $[B]_{\text{real}}$:

$$[S] = \frac{\text{Menge}}{MG \cdot (FG/TG - 1)} \quad (32)$$

2.4 Peeling-off der Auswaschkurven

Peeling-off ist ein Verfahren mit dem eine experimentell erhaltene "Wachstumskurve" in ihre exponentiellen Teilglieder zerlegt werden kann (GOLD 1977). Dieses Verfahren wurde anfänglich zur Analyse der Wachstums- oder Vermehrungskurve einer nicht-homogenen, aus mehreren Subpopulationen zusammengesetzten Tierpopulation entwickelt. Nur *innerhalb* einer Subpopulation, so die Vorstellung, verhalten sich die Individuen bezüglich Fortpflanzungs- und Sterberate gleich, was zur folgenden Beschreibung des Wachstums einer nicht-homogenen Population führt:

$$N(t) = N_{1,0} \cdot e^{k_1 \cdot t} + N_{2,0} \cdot e^{k_2 \cdot t} + \dots + N_{r,0} \cdot e^{k_r \cdot t} \quad (33)$$

$N(t)$ = Anzahl Individuen zur Zeit t

r = Anzahl Subpopulationen

$N_{r,0}$ = Anzahl Individuen zur Zeit $t = 0$ in der r -ten Subpopulation

k_r = Wachstumsrate (Fortpflanzungs- und Sterberate) der r -ten Subpopulation

Eine weitere Anwendung einer solchen Gleichung wäre die *Kompartimentierungsanalyse* einer Komponente, die aus tierischem oder pflanzlichem Gewebe austritt. Hierbei muss man sich vorstellen, dass die "Molekülspezies" in Subpopulationen unterteilt ist, die sich in verschiedenen Zellkompartimenten befinden. Die Diffusionsgeschwindigkeit einer molekularen Subpopulation ist - analog der Vermehrungsrate - für jedes Kompartiment verschieden. Da bei Auswaschversuchen die Grösse einer Subpopulation *abnimmt*, erhält die Wachstumsrate ein negatives Vorzeichen. Für die Auswaschversuche werden die Symbole aus Gleichung (33) wie folgt definiert:

- $N(t)$ = Coffeinmenge [μg] in den Blattscheiben zur Zeit t
 r = Anzahl Kompartimente
 $N_{r,0}$ = Coffeinmenge [μg] zur Zeit $t = 0$ im r -ten Kompartiment; Initialwert
 $-k_r$ = Diffusions- oder Geschwindigkeitskonstante des r -ten Kompartiments

Mit dem nachfolgenden Prozedere (Peeling-off) wurde die Anzahl der Kompartimente mit dazugehörigen Initialwerten und Diffusionskonstanten bestimmt:

1. $\ln N(t)$ wird gegen die Zeit t aufgetragen.
2. Eine Gerade wird geschätzt, die einem Teil der Kurve möglichst gut angenähert wird.
3. Bestimmung der Diffusionskonstanten (= Steigung) und des Initialwertes (= Ordinatenabschnitt) mit Hilfe der in 2. geschätzten Geraden.
4. Von jedem, in 2. unberücksichtigtem Wert $N(t)$ wird $N_{r,0} \cdot e^{k_r \cdot t}$ (Parameter aus 3. eingesetzt) subtrahiert.
5. Die natürlichen Logarithmen der erhaltenen Werte aus 3. werden gegen die Zeit t aufgetragen.
6. Kann unter Einbezug *aller* Punkte eine Gerade angepasst werden, geht man zu 3. und beendet das "Abschälen", ansonsten durchläuft man das ganze Prozedere, beginnend bei 2., ein weiteres Mal.

Sollen die Kompartimente mit hinreichender Sicherheit gegeneinander abgegrenzt sein, müssen sich die Diffusionskonstanten um den Faktor 10 unterscheiden.

3. VORVERSUCHE

3.1 Ergebnisse und Diskussion

Wie schon in der Einleitung erwähnt, interessierte die Alkaloidproduktion in Kulturen von höher differenziertem Gewebe. Wenn man vom homogenen Zellphänotyp der Aggregate von Suspensionskulturen ausgeht, kann als der einfachste und zugleich vielversprechendste Differenzierungsvorgang die Induktion der Chlorophyllbildung angesehen werden. Die Vorteile eines solchen Schrittes liegen auf der Hand: Ein zuvor heterotrophes Pseudogewebe erlangt Autotrophie - vorausgesetzt, Chlorophyll bedeute gleichfalls intaktes Photosynthesesystem - und ist somit eher vergleichbar mit den Palisadenzellen im Blatt.

3.1.1 Kalluskulturen

In diesem Vorversuch sollten Chlorophyllbildung und Alkaloidproduktion unter dem Einfluss der Faktoren "Medium" und "Licht/Dunkel" studiert werden. Zu diesem Zwecke wurden die Kalli, erhalten aus plagiotropen Internodienstücken 2 ½ Jahre alter Pflanzen, 4 verschiedenen Bedingungen ausgesetzt (siehe 2.1.2.2.1).

Bevor auf die Resultate eingegangen wird, ist zur Statistik folgende Anmerkung zu machen: Da z.T. grosse Standardabweichungen bei kleiner Stichprobengrösse auftreten, erfolgte eine Beurteilung auf Unterscheidbarkeit, resp. Gleichheit mit Hilfe eines *t-Tests*. Als zu widerlegende Nullhypothese wurde jeweils $\mu_1 = \mu_2$ postuliert, weil in keinem der zu testenden Fälle eine *begründete Hypothese* über die Richtung der zu erwarteten Unterschiede gemacht werden konnte (wie z.B. $\mu_1 > \mu_2$). Es handelt sich also um eine zweiseitige Fragestellung, deren Antwort bezüglich der zu erwartenden Irrtumswahrscheinlichkeit α immer zweiseitig abgesichert werden muss (SACHS 1984). Im folgenden gelten 2 Werte als signifikant unterschiedlich, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit α höchstens 5% betrug. Dabei wurden nur Resultate aus Versuchen mit *einem* unterschiedlichen Parameter gegeneinander getestet, was 4 zweiseitige Tests ergab:

S ⁺ , Licht	<--->	S ⁺ , Dunkel
S, Licht	<--->	S, Dunkel
S ⁺ , Licht	<--->	S, Licht
S ⁺ , Dunkel	<--->	S, Dunkel

Nach 4wöchiger Kulturdauer unterschieden sich die belichteten Kulturen von den im Dunkeln gehaltenen lediglich durch das Vorhandensein grünlicher, chlorophyllhaltiger Gewebsinseln. Das Wachstum aller Ansätze war gleich. Nach weiteren 3 Wochen besaßen die Kulturen im Licht einen signifikant grösseren TG-Anteil ($\alpha = 2\%$, Tab. 3). Allerdings ist diese Erhöhung auf einen vergrösserten Wasseranteil zurückzuführen, da bezüglich des

Trockengewichts keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Kulturen vorhanden waren. Im Dunkeln bewirkte das S-Medium ein deutlich höheres Frischgewicht gegenüber S^+ ($\alpha = 0.1\%$).

Tabelle 3: Analyse von primären Kalluskulturen aus plagiotropen, apikalen Internodien nach 7wöchiger Kulturdauer. Die Anfangswerte betrugen für Coffein 2.37 mg/g TG und für Theobromin 0.20 mg/g TG bei einem Inokulum von 5 - 10 mg Trockengewicht. Es werden Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobengrößen (in Klammern) angegeben. TG = Trockengewicht, FG = Frischgewicht, GA = Gesamtalkaloide [Theobromin + Coffein], Tb = Theobromin.

	S^+ -Medium		S-Medium	
	im Dunkeln	im Licht	im Dunkeln ^a	im Licht
Frischgewicht [mg]	567 ± 257 (5)	746 ± 332 (5)	782 ± 101 (5)	461 ± 96 (5)
TG/FG in %	8.53 ± 1.37 (4)	13.06 ± 1.60 (5)	11.33 ± 3.39 (4)	19.80 ± 2.84 (3)
GA in Kallus und Medium [mg]	1.21 ± 0.49 (3)	9.54 ± 1.21 (4) ^b	2.83 ± 1.16 (4)	7.53 ± 1.39 (3)
GA im Kallus in %	44.9 ± 13.9 (3)	33.4 ± 4.0 (4) ^b	36.6 ± 5.8 (4)	27.3 ± 3.0 (3)
Tb/GA im Kallus in %	8.78 ± 2.53 (3)	6.24 ± 1.55 (4) ^b	3.98 ± 0.79 (4)	2.32 (2) ^b
Tb/GA im Medium in %	10.48 ± 2.27 (3)	11.51 ± 2.43 (4) ^b	5.71 ± 0.56 (4)	6.97 ± 0.91 (3)
Coffein [mg/g TG]	33.7 ± 5.0 (3)	73.1 ± 11.1 (5)	31.0 ± 6.3 (4)	70.3 ± 1.4 (3)
Coffeinkonz. im Kallus [μ g/ml Wasseranteil]	1310 ± 440 (3)	4120 ± 960 (4) ^b	1470 ± 590 (4)	4990 ± 1220 (3)
Coffeinkonz. im Medium [μ g/ml Medium]	41 ± 23 (3)	374 ± 36 (4) ^b	116 ± 54 (4)	337 ± 54 (3)
Chlorophyll a und b [μ g/g FG]	0 ^c	61 ± 11 (3)	0 ^c	151 ± 26 (4)

^a Temperatur und Medium nach FRISCHKNECHT et al., Planta medica **31**, 344-350 (1977)

^b Ein "Ausreisser" wurde eliminiert und bei der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt.

^c Eine Absorption < 0.05 wurde als Null betrachtet.

3.1.1.1 Theobromin und Coffein

Mit hoher Signifikanz ($\alpha = 2\%$) zeigen die Kulturen auf S^+ - und S-Medium im Licht eine 8fach, resp. 3fach höhere Gesamtalkaloidmenge, wobei die grösste absolute Gesamtalkaloidmenge (9.54 mg) auf S^+ -Medium produziert wurde ($\alpha = 1\%$). Der prozentuale Anteil der Gesamtalkaloide, der im Kallus gefunden wird, ist nur signifikant unterschiedlich ($\alpha \leq 1\%$) bezüglich des Faktors Licht/Dunkel, nicht aber bezüglich der beiden Medien. Einerseits wird im Licht ein geringerer prozentualer Anteil an Gesamtalkaloiden im Kallus gefunden, andererseits aber ist der Absolutwert, bedingt durch die grössere Totalmenge, weit höher als in einem im Dunkeln gewachsenen Kallus. Dieser

Sachverhalt spiegelt sich ebenfalls in der 3fach höheren Coffeinkonzentration von 4000 - 5000 µg/ml Wasseranteil des im Licht kultivierten Gewebes wieder ($\alpha \leq 1\%$). Betrachtet man die korrespondierenden Konzentrationen im Medium, so beeindrucken die 10fach geringeren Werte. Bei den "Dunkel"-Kulturen auf S⁺-Medium unterscheiden sich die Konzentrationen in Kallus und Medium sogar um das 30fache. Trotz grosser Mengen von Coffein im Medium kann dieses offensichtlich nicht ungehindert aus dem synthetisierenden Gewebe austreten, würden sich sonst die Konzentrationen innert kürzester Frist gegenseitig angleichen. Die Ursache für dieses Phänomen muss in einer mehr oder minder starken Fixierung des Coffeins innerhalb des Gewebes gesehen werden. Gemäss der *Komplexierungs-Hypothese* (SONDHEIMER et al. 1961; HORMAN und VIANI, 1972) kann Coffein mit Chlorogensäure (CGA) komplexiert werden, wodurch der Austritt aus dem Gewebe verunmöglicht wird. Für das Zustandekommen eben dieses Coffein-CGA-Komplexes in den untersuchten Kalli spricht auch die Tatsache, dass CGA in Gewebekulturen von *Coffea arabica* in bedeutenden Mengen vorkommt, wobei die Konzentrationen in "Licht"-Kulturen erhöht sind (BURTSCHER 1987). Es kann hinzugefügt werden, dass ausschliesslich das Licht zu einer Erhöhung des CGA-Gehaltes führt. Ein weiterer Hinweis auf die intrazelluläre Komplexierung des Coffeins kann im prozentualen Theobrominanteil der Gesamtalkaloide (Tb/GA in %, Tab. 3) gesehen werden: Der prozentuale Anteil ist im Kallus gegenüber dem Medium deutlich tiefer, d.h. Theobromin kann besser als Coffein aus dem Gewebe austreten. Berechnet man die Konzentrationen an Theobromin, bezogen auf den Wasseranteil des Kallus und des Mediumvolumens, wird ersichtlich (Tab. 4), dass zwar keine 1:1-Verteilung vorliegt, dass aber das Konzentrationsgefälle vom Kallus zum Medium geringer ist, immer verglichen mit den entsprechenden Werten des Coffeins.

Tabelle 4: Konzentrationsgefälle für Theobromin und Coffein vom Kallus zum Medium. Die Werte geben an um welchen Faktor die Konzentrationen (in µg/ml) im Kallus gegenüber den Konzentrationen im Medium erhöht sind.

	S ⁺ -Medium		S-Medium	
	im Dunkeln	im Licht	im Dunkeln	im Licht
Theobromin	20	6	9	5
Coffein	30	11	13	15

Die Vermutung liegt nahe, dass Theobromin ebenfalls von der Chlorogensäure oder einem anderen Molekül komplexiert wird, allerdings in weniger starkem Masse. Die schwächere Komplexierung könnte Folge einer kleineren Komplexierungskonstanten des Theobromin-CGA-Komplexes sein, was bedeuten würde, dass Coffein kompetitiv "um die Gunst" der CGA-Molekel "wirbt" und Theobromin in der Folge verdrängt.

Vergleicht man die Ergebnisse des "Dunkel"-Versuches auf S-Medium mit denjenigen von FRISCHKNECHT et al. (1977a, 1977b), findet man, dass die vorliegenden Coffeingehalte in jedem Fall deutlich erhöht sind (31 mg/g TG gegenüber 11 - 16 mg/g TG). Die aufgeführten Punkte versuchen hierfür Erklärungen zu liefern:

- Die Analyse des Coffeins erfolgte bei FRISCHKNECHT et al. (1977a, 1977b) mittels ethanolischer Extraktion, gefolgt von einer Ausschüttelung in CHCl_3 . Nach einem Reinigungsschritt an MgO wurde der Auszug dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die ausgeschnittenen und eluierten "Spots" wurden spektrophotometrisch quantifiziert (LOOSER et al. 1974). Aufgrund des hohen manipulatorischen Aufwandes dieser Methode muss mit gewissen Verlusten gerechnet werden.
- Im Gegensatz zu FRISCHKNECHT et al. (1977a, 1977b), die ausschliesslich mit *orthotrop* gewachsenen Internodienstücken 18 Monate alter Kaffeesträucher arbeiteten, wurde *plagiotropes* Material verwendet. Allerdings ist zu bemerken, dass die Coffeingehalte *in situ*, sowohl für ortho- als auch für plagiotrope Internodien, zwischen 2.4 und 3.0 mg/g TG liegen.
- Die Entwicklungsfähigkeit der internodalen Gewebekulturen war unterschiedlich. An dieser Stelle muss auch auf die oftmals festgestellte, enorme *Variabilität* des Pflanzenmaterials hingewiesen.
- Mediumzusammensetzung und Temperatur waren möglicherweise nicht absolut identisch.

Die drei letztgenannten Punkte sind höchstwahrscheinlich auch für das bis 3fach höhere Frischgewicht (FG) eigener, 7wöchiger Kulturen verantwortlich. Das beachtliche FG macht verständlich, dass die absolute Coffeinemenge eigener Kalluskulturen erhöht ist (ca. 5mal).

Die Verteilung des Coffeins zwischen Kallus und Medium zeigt in den verglichenen Arbeiten beachtliche Unterschiede: Nach eigener Untersuchung befindet sich nach 7wöchiger Kulturdauer rund 30% des Coffeins im Kallus. Demgegenüber bleiben nach FRISCHKNECHT et al. (1977b) entweder 50 - 70% (nach 5 Wochen), oder aber 10 - 20% (nach 5, bzw. 7 Wochen) im Kallus. Wird das nur *im Kallus* gefundene Coffein auf das TG bezogen, ergibt dies Coffeingehalte von 0.3 - 0.8% (5 Wochen), resp. 0.1 - 0.3% (7 Wochen). Kalli eigener Kulturen enthielten nach 7wöchigem Wachstum 1.0 - 1.1% Coffein.

3.1.1.2 Chlorophyll

Die Kalli der belichteten Kulturen zeigten nach 7 Wochen eine eindruckliche Grünfärbung (siehe Chlorophyll a und b, Tab. 3). FRISCHKNECHT et al. (1977b) erwähnen leider keine Beobachtungen zur Pigmentierung der mit 2000 Lux bestrahlten Kalli. Der Chlorophyllgehalt konnte durch die Wahl eines geeigneten Mediums (hier S) von 0.061 auf 0.150 mg/g FG positiv beeinflusst werden, wobei auch die absolute Chlorophyllmenge deutlich erhöht wurde. Vergleichsweise entspricht dies etwa 5% des Chlorophyllgehaltes in Blättern von *Coffea arabica*. Mit steigendem Blattalter erfolgt bei diesen eine Zunahme von 2.5 auf bis zu 3.2 mg/g FG (BURTSCHER 1987).

Wie aus Tabelle 3 weiter ersichtlich ist, besteht kein Zusammenhang zwischen dem Chlorophyllgehalt und der Produktivität an Coffein. Dies ist ganz im Einklang mit den Untersuchungen von FRISCHKNECHT et al. (1982), die ausdrücklich keine Verbindung zwischen Photosyntheseaktivität und Sekundärstoffproduktion feststellen konnten.

3.2 Suspensionskulturen

Sämtliche Versuche, aus den Kalli grüne Suspensionskulturen zu etablieren, misslangen. Die Kalli der "Licht"-Kulturen wurden zu diesem Zweck zerteilt und in S⁺-Flüssigmedium gegeben. Diese Suspensionen (5 - 8 Erlenmeyerkolben pro Bedingung) wurden ans Licht gestellt und in Abständen von 14, 7, 14, 14 und 27 Tagen mit neuem Medium versorgt. Obwohl nach einer anfänglich grünlich-braunen Pigmentierung der Zellaggregate meist eine Phase weiteren Ergrünens folgte, konnten nie Kulturen in genügender Anzahl und über einen längeren Zeitraum hinweg etabliert werden. Früher oder später bildeten sich dunkle Zellaggregate, worauf die Kulturen ihr Wachstum einstellten. Die Verbräunung gilt als eine Folge der Aktivierung der Phenoloxidasen, einhergehend mit der Nekrose des Gewebes. Versuche mit Suspensionskulturen, die nach längerer Kultivierung im Dunkeln ins Licht gestellt wurden, zeigten schon nach wenigen Tagen eine Braunfärbung.

Abschliessend sei auf die Arbeit von BURTSCHER (1987) hingewiesen, die sich eingehend mit der Problematik der Etablierung grüner Suspensionskulturen bei *Coffea arabica* beschäftigt.

4. HAUPTVERSUCHE

4.1 Komplexierung der Purinalkaloide

Wie aus den Vorversuchen mit Kalluskulturen (siehe 3) deutlich hervorgeht, trifft man in keinem Fall eine Gleichverteilung der Purinalkaloide zwischen Gewebe und Medium an. Dies ist umso erstaunlicher, da Coffein, bekanntester und bestuntersuchter Vertreter aus der Reihe der Purinalkaloide, die Eigenschaft besitzt, leicht durch biologische Membranen zu permeieren. So gelang es PFRUNDER et al. (1980) nicht, Coffein in Protoplasten nachzuweisen, die aus dem Endosperm von Kaffeesamen (*Coffea arabica*) isoliert worden waren. Offenbar diffundierte Coffein während der enzymatischen Verdauung der Zellwände aus dem Zellinnern in die Aussenlösung. Einen weiteren Hinweis auf den lipophilen Charakter des Coffeins erhalten wir aus dem Methodenteil einer Arbeit von FRISCHKNECHT und BAUMANN (1980) in der es, geltend für Suspensionskulturen, heisst: "... *when the tracer* ([2-¹⁴C]-Coffein, Anm. d. Autors) *was dispersed homogeneously between tissue and medium.*" Dass die gute Permeabilität des Coffeins schon seit langem bekannt ist, zeigt der klassische Schulversuch mit der fädigen Grünalge *Spirogyra*: Wird die Süßwasseralge in eine coffeinhaltige Lösung (> 0.1mg/ml) transferiert, so sind innerhalb weniger Minuten vibrierende Partikel im Zellinnern (vermutlich in der Vakuole) mit Hilfe des Lichtmikroskopes zu beobachten, die als Komplexe, gebildet aus den zellinternen Tanninen mit dem *einströmenden* Coffein, aufgefasst werden müssen. Dieser Versuch demonstriert zwei Eigenschaften des Coffeins, nämlich (1) *rasch zu permeieren* und (2) *Komplexe mit aromatischen Verbindungen zu bilden*. Letztere wurde von MUELLER und GREENWOOD (1978) erfolgreich eingesetzt um die vakuolär gespeicherten Phenole in Wurzelzellen von Baumwolle und Banane erstmals elektronenmikroskopisch nachzuweisen. Die Komplexbildung hat möglicherweise auch eine toxikologische Bedeutung (DANNENBERG 1963), da Coffein die Wasserlöslichkeit von kanzerogenen Substanzen wie z.B. 3,4-Benzpyren, Phenantren und Anthracen bis um das 10'000fache erhöht (EISENBRAND und BAUMANN, 1969a, 1969b, 1970).

In der Tat gelang es GORTER (1907, 1908) aus grünen Kaffeebohnen den Kalium-Chlorogenat-Coffein-Komplex zu isolieren. Aus dem kristallisierten 1:1-Komplex lässt sich Coffein selbst mit Chloroform nicht mehr herausextrahieren. SONDHEIMER et al. (1961) ermittelten *in vitro* eine Komplexierungskonstante von $44 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$. Die Idee einer Komplexierung *in situ* veranlasste SONDHEIMER (1964) zur folgenden Feststellung: "...*in coffee beans that contain 5% chlorogenic acid and 1.5% caffeine, 43% of the chlorogenic acid and 78% of the caffeine would be present as the complex.*"³ Des weiteren ist bekannt,

³ Zur Berechnung der komplexierten, prozentualen Anteile der am Geschehen beteiligten Komponenten wird auf Abschnitt 2.3.4 verwiesen.

dass es sich um einen "hydrophobically-bound" π -molekularen Komplex (HORMAN und VIANI, 1972) handelt, d.h. die π -Elektronen der Doppelbindungen im Coffein und im Kaffeesäurerest bilden ein intermolekulares π -System.

In den folgenden Versuchen wurden die Komplexe aus der im Pflanzenreich beinahe ubiquitär verbreiteten Chlorogensäure (CGA; Abb. 2) mit den Purinalkaloiden Coffein, Theobromin, Theophyllin, Paraxanthin und Theacrin untersucht.

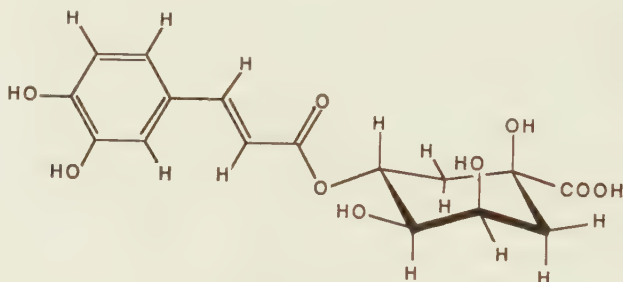


Abbildung 2: Die Chlorogensäure

4.1.1 Komplexierungskonstanten und Extinktionskoeffizienten

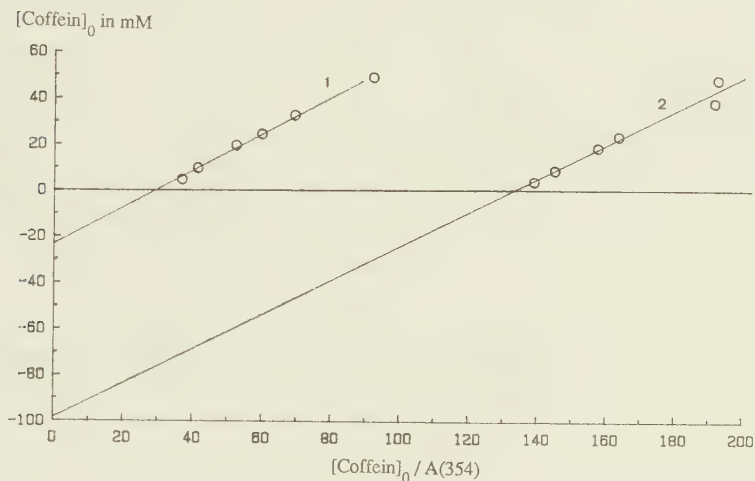
4.1.1.1 Der Coffein-CGA-Komplex

Die Komplexierungskonstante K_c des Coffein-Chlorogensäure-Komplexes wurde zuerst nach Verfahren I (siehe 2.3.2.1.1) für 25°C und 60°C ermittelt (Tab. 5; Abb. 3). Mit Kenntnis der Temperaturabhängigkeit ist es möglich, die Wärmetönung ΔH^0 und die Entropie ΔS^0 zu berechnen, woraus sich wiederum Informationen über die Art der "Komplexbindung" gewinnen lassen.

Tabelle 5: Absorptionen, gemessen bei 354 nm und 25°C, bzw. 60°C, für verschiedene Coffeinkonzentrationen (mM) in 0.2 mM CGA-Lösung. Die Referenzküvette enthielt 0.2 mM CGA-Lösung.

Ansatz	$[Coffein]_0$	$A(354)$		$[Coffein]_0 / A(354)$	
		bei 25°C	bei 60°C	bei 25°C	bei 60°C
1	5.00	0.136	0.036	36.76	138.9
2	10.00	0.242	0.069	41.32	144.9
3	20.00	0.382	0.127	52.36	157.4
4	25.00	0.418	0.153	59.81	163.4
5a	33.33	0.481	-----	69.30	-----
5b	40.00	-----	0.209	-----	191.4
6	50.00	0.543	0.260	92.08	192.3

Abbildung 3: Berechnete Korrelationsgeraden für 25°C (1: $r = 0.9984$) und 60°C (2: $r = 0.9848$) anhand der 6 Datenpaare aus Tabelle 5. Ihre Schnittpunkte mit der y-Achse ergeben die gesuchten $-K_c^{-1}$ (1: -23.35 mM; 2: -98.51 mM). Die Geraden weisen eine Steigung von 0.8060 (1) und 0.7498 (2) auf.



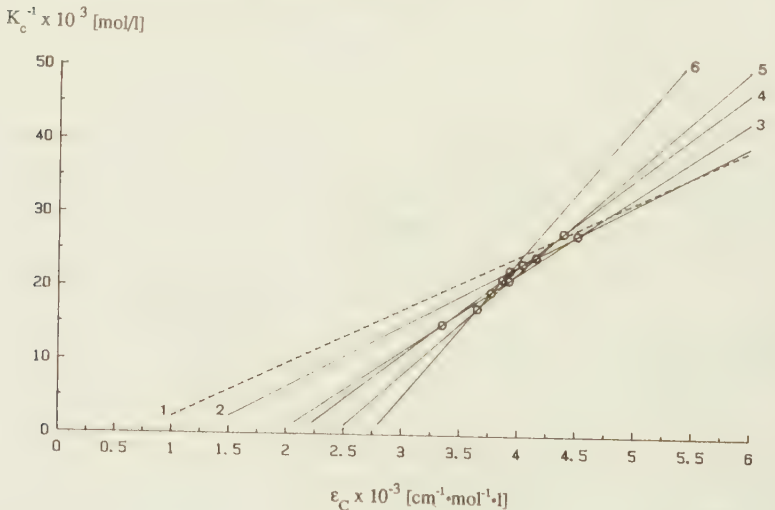
Aus der Korrelationsgeraden, gültig für die Messreihe bei 25°C, liess sich eine Komplexbildungskonstante K_c von **42.8 l·mol⁻¹** und ein molarer Extinktionskoeffizient ϵ_c von **4030 cm⁻¹·mol⁻¹·l** ermitteln. Aus derjenigen für 60°C erhielt man ein K_c von **10.2 l·mol⁻¹** und ein ϵ_c von **3750 cm⁻¹·mol⁻¹·l**.

Vergleichsweise wurden K_c und ϵ_c ebenfalls mit dem arbeitsintensiveren Verfahren II (siehe 2.3.2.1.1) mit Hilfe der gleichen Messreihen (25°C und 60°C) ermittelt. Hierzu muss zu jedem Messansatz, bestehend aus der Absorption, der CGA- und der Coffeinkonzentration eine "Gerade" gezeichnet werden, wofür man mindestens 2 errechnete Punkte (ϵ_c , K_c^{-1}) benötigt (Tab. 6, Abb. 4). Da das rein graphische Vorgehen nur sehr ungenaue Schnittpunkte der interessierenden "Geraden" liefert, wurden jene rechnerisch mit Gleichung (17) und (14) ermittelt (siehe 2.3.2.1.1). Unter Nichtberücksichtigung der "Geraden" 1 wurden von den verbleibenden "Geraden" (2 bis 6) 10 Schnittpunkte mit den entsprechenden Wertepaaren ϵ_c und K_c^{-1} erhalten (Tab. 7).

Tabelle 6: Für jeden Messansatz werden unter Verwendung von Gleichung (14) durch Einsetzen von beliebigen ϵ_c ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$) die dazugehörigen K_c^{-1} -Werte ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) erhalten. $[\text{Coffein}]_0$ ist in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ angegeben.

Ansatz	$[\text{Coffein}]_0$	$A(354)$	$K_c^{-1} \times 10^3$ bei	
			$\epsilon_c = 2500$	$\epsilon_c = 6000$
1	5.00	0.136	13.2	38.9
2	10.00	0.242	10.6	39.4
3	20.00	0.382	6.1	42.7
4	25.00	0.418	4.9	46.6
5	33.33	0.481	1.3	49.7
6	50.00	0.543	-3.9	60.4

Abbildung 4: Darstellung der "Geraden" mit Hilfe der errechneten Datenpaare aus Tabelle 6 (Verfahren II). Die Numerierung der Geraden entspricht dem jeweiligen Ansatz der Coffeinreihe. Gerade 1 wurde in der Mittelwertbildung von K_c und ϵ_c nicht berücksichtigt. Die markierten Schnittpunkte (o) wurden rechnerisch ermittelt.



Zur Mittelwertbildung wurden alle errechneten Schnittpunkte gleichgewichtet. Anhand dieses Verfahrens konnte $\epsilon_c(25^\circ\text{C})$ mit $(3960 \pm 340) \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ und $K_c(25^\circ\text{C})$ mit $(47.3 \pm 9.5) \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ bestimmt werden.

Tabelle 7: Berechnung der Schnittpunkte (ϵ_c, K_c^{-1} , für 25°C) zwischen den "Geraden" 2 bis 6, welche den entsprechenden Coffeinansätzen zugeordnet sind.

Schnittpunkt	$\epsilon_c [\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}]$	$K_c^{-1} \times 10^3 [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$	$K_c [\text{l} \cdot \text{mol}^{-1}]$
2-3	4518	27.19	36.78
2-4	4045	23.29	42.93
2-5	4160	24.24	41.26
2-6	3933	22.36	44.72
3-4	3347	14.97	66.82
3-5	3928	21.03	47.56
3-6	3771	19.38	47.56
4-5	4397	27.49	36.38
4-6	3869	21.17	47.23
5-6	3651	17.18	58.22

Tabelle 8: Berechnung der Schnittpunkte (ϵ_c, K_c^{-1} , für 60°C) zwischen den "Geraden" 1 bis 4 und 6, welche den entsprechenden Coffeinansätzen zugeordnet sind.

Schnittpunkt	$\epsilon_c [\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}]$	$K_c^{-1} \times 10^3 [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$	$K_c [\text{l} \cdot \text{mol}^{-1}]$
1-2	4133	109.6	9.12
1-3	4028	106.7	9.37
1-4	4074	108.0	9.26
1-6	4207	111.7	8.95
2-3	3977	105.1	9.51
2-4	4055	107.3	9.32
2-6	4216	112.0	8.93
3-4	4219	112.7	8.87
3-6	4303	115.3	8.67
4-6	4320	116.0	8.62

Für die Messreihe, aufgenommen bei 60°C, wurde Ansatz 5b (aus Tab. 5) bei der Schnittpunktbestimmung nicht berücksichtigt, so dass zur Mittelwertbildung von K_c und ϵ_c jeweils 10 Werte zur Verfügung standen (Tab. 8). Auf diese Weise wurde ein ϵ_c von **(4150 ± 120) cm⁻¹·mol⁻¹·l** und ein K_c von **(9.06 ± 0.30) l·mol⁻¹** erhalten.

4.1.1.2 Der Theobromin-CGA-Komplex

Die Bestimmung der Komplexbildungskonstanten K_c für den *Theobromin-Chlorogensäure-Komplex* erwies sich aufgrund der geringen Löslichkeit des Theobromins in Wasser als schwierig. Obwohl mit Verfahren I (siehe 2.3.2.1.1) eine Korrelationsgerade erhalten wurde, deren Korrelationskoeffizient r einen Wert von 0.9553 (!) erreichte, erwiesen sich die K_c - und ϵ_c -Werte als völlig unbrauchbar.

Tabelle 9: Für jeden Messansatz werden unter Verwendung von Gleichung (14) durch Einsetzen von beliebigen ϵ_c ($\text{cm}^1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$) die dazugehörigen K_c^{-1} -Werte ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) erhalten. $[\text{Theobromin}]_0$ ist in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ angegeben.

Ansatz	$[\text{Theobromin}]_0$	A(354)	$K_c^{-1} \times 10^3$ bei	
			$\epsilon_c = 1000$	$\epsilon_c = 3500$
1	1.429	0.0234	10.6	41.1
2	1.666	0.0261	10.9	42.8
3	1.818	0.0299	10.2	40.6
4	2.00	0.0323	10.2	41.2
5	2.22	0.0377	9.4	38.8
6	2.50	0.0396	10.0	41.5

Eine Analyse mittels dem aufwendigen, graphisch-rechnerischen Verfahren II erlaubte es, jeden einzelnen Ansatz auf seine "Präzision" hin zu prüfen. Hierzu wurden für jedes Datenpaar ($[\text{Theobromin}]_0$, A(354)) seine dazugehörigen Punkte (ϵ_c , K_c^{-1} ; Tab. 9) ermittelt, mit denen die "Geraden" gezeichnet werden konnten. Die graphische Schnittpunktbestimmung wurde allerdings durch die nahezu identischen Steigungen der "Geraden" verunmöglicht. Von den 15 berechenbaren Schnittpunkten erwiesen sich 3 als brauchbar (Tab. 10). Die restlichen Schnittpunkte ergaben entweder K_c -Werte $> 100 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ oder solche die **negativ** waren.

Tabelle 10: Berechnung der Schnittpunkte (ϵ_c , K_c^{-1}) zwischen den "Geraden" 1, 4 und 6, welche den entsprechenden Theobrominansätzen zugeordnet sind.

Schnittpunkt	ϵ_c [$\text{cm}^1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$]	$K_c^{-1} \times 10^3$ [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]	K_c [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$]
1-4	3339	39.15	25.54
1-6	2580	29.90	33.45
4-6	2048	23.18	43.14

Es resultiert ein K_c von $(34.0 \pm 8.8) \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ und ein ϵ_c von $(2660 \pm 650) \text{ cm}^1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$.

4.1.1.3 Der Paraxanthin-CGA-Komplex

Die nach Verfahren I erhaltene Darstellung von $[\text{Paraxanthin}]_0$ vs $[\text{Paraxanthin}]_0/A(354)$ aller 6 Ansätze ergab eine Korrelationsgerade ($r = 0.9734$) mit einer Steigung von 0.6933, woraus sich ϵ_C ($3460 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$) errechnen liess. Der Schnittpunkt mit der y-Achse führte zu einem K_c -Wert von $29.2 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Tabelle 11: Für jeden Messansatz werden unter Verwendung von Gleichung (14) durch Einsetzen von beliebigen ϵ_C ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$) die dazugehörigen K_c -Werte ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) erhalten. $[\text{Paraxanthin}]_0$ ist in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ angegeben.

Ansatz	$[\text{Paraxanthin}]_0$	$A(354)$	$K_c^{-1} \times 10^3$ bei	
			$\epsilon_C = 1000$	$\epsilon_C = 7000$
1	7.69	0.127	4.3	76.9
2	8.33	0.134	4.0	78.5
3	9.10	0.148	3.1	76.8
4	10.00	0.156	2.8	79.6
5	11.10	0.170	1.9	80.1
6	12.50	0.186	0.8	81.4

Tabelle 12: Berechnung der Schnittpunkte (ϵ_C, K_c^{-1}) zwischen den "Geraden" 2, 4, 5 und 6, welche den entsprechenden Paraxanthinansätzen zugeordnet sind.

Schnittpunkt	$\epsilon_C [\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}]$	$K_c^{-1} \times 10^3 [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$	$K_c [\text{l} \cdot \text{mol}^{-1}]$
2-4	4292	44.90	22.17
2-5	4412	46.36	21.57
2-6	4124	42.77	23.38
4-5	4603	48.85	20.47
4-6	4018	41.36	24.18
5-6	3653	36.46	27.43

Die für Verfahren II benötigten "Geraden", wurden mit Hilfe der errechneten Datenpaare (ϵ_C, K_c^{-1} ; Tab. 11) konstruiert. Aus der erhaltenen Graphik war ersichtlich, dass die Geraden 1 und 3 nicht bei der Schnittpunktbildung berücksichtigt werden durften. Mit den verbleibenden 4 "Geraden" konnten 6 Schnittpunkte errechnet werden (Tab. 12). Aus der Mittelwertbildung resultiert ein K_c von $(23.2 \pm 2.4) \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ und ein ϵ_C von $(4180 \pm 330) \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$.

4.1.1.4 Der Theophyllin-CGA-Komplex

Die aus Verfahren I erhaltene Korrelationsgerade ($r = 0.9716$) aller 6 Datenpaare wies eine Steigung von 0.8790 auf, was einem ϵ_C von **4400** $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ entspricht. Die Komplexierungskonstante K_C beträgt **21.1** $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Tabelle 13: Für jeden Messansatz werden unter Verwendung von Gleichung (14) durch Einsetzen von beliebigen ϵ_C ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$) die dazugehörigen K_C -Werte ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) erhalten. $[\text{Theophyllin}]_0$ ist in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ angegeben.

Ansatz	$[\text{Theophyllin}]_0$	A(354)	$K_C^{-1} \times 10^3$ bei	
			$\epsilon_C = 1500$	$\epsilon_C = 3500$
1	5.00	0.084	12.6	36.3
2	10.00	0.147	10.3	37.5
3	12.50	0.187	7.5	34.1
4	14.29	0.205	6.6	34.4
5	16.66	0.228	5.2	34.4
6	20.0	0.263	2.8	33.1

Tabelle 14: Berechnung der Schnittpunkte (ϵ_C, K_C^{-1}) zwischen den "Geraden" 3 bis 6, welche den entsprechenden Theophyllinansätzen zugeordnet sind.

Schnittpunkt	$\epsilon_C [\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}]$	$K_C^{-1} \times 10^3 [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$	$K_C [\text{l} \cdot \text{mol}^{-1}]$
3-4	3117	29.03	34.45
3-5	3322	31.77	31.48
3-6	4066	41.70	23.98
4-5	3493	34.26	29.19
4-6	4494	48.22	20.74
5-6	5602	65.06	15.37

Die mit Verfahren II erhaltenen Daten sind aus den Tabellen 13 und 14 ersichtlich. Die "Geraden" 1 und 2 wurden bei der Mittelwertbildung von K_C und ϵ_C nicht berücksichtigt. Der Extinktionskoeffizient ϵ_C beträgt **(4020 $\pm$ 930)** $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$. K_C errechnete sich nach diesem Verfahren zu **(25.9 $\pm$ 7.2)** $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$.

4.1.1.5 Der Theacrin-CGA-Komplex

Die Komplexbildungskonstante K_c und der Extinktionskoeffizient ϵ_c des *Theacrin-Chlorogensäure-Komplexes* konnten nach Verfahren I (siehe 2.3.2.1.1) nicht ermittelt werden, da die Korrelationsanalyse der Daten ($[\text{Theacrin}]_0$ vs $[\text{Theacrin}]_0 / A(354)$; Tab. 15) eine Gerade ergab, die einen Korrelationskoeffizienten $r = 0.1410$ aufwies.

Tabelle 15: Absorptionen, gemessen bei 354 nm, für verschiedene Theacrinkonzentrationen (mM) in 0.2 mM CGA-Lösung. Die Referenzküvette enthielt 0.2 mM CGA-Lösung.

Ansatz	$[\text{Theacrin}]_0$	$A(354)$	$[\text{Theacrin}]_0 / A(354)$
1	1.43	0.039	36.67
2	1.67	0.047	35.53
3	2.00	0.058	34.48
4	2.50	0.073	34.25
5	3.33	0.097	34.33
6	4.29	0.116	36.98

Die Analyse nach Verfahren II konnte ebenfalls nicht durchgeführt werden, weil die konstruierten "Geraden" mehr oder weniger parallel verliefen und somit Schnittpunktbestimmungen verunmöglicht wurden.

Unter der Annahme, dass es sich um einen 2:1-Komplex (Theacrin:CGA) handle, wurden die Daten nach Verfahren III (siehe 2.3.2.1.2) bearbeitet.

Tabelle 16: Schnittpunktbestimmung mit Hilfe des Tangentennäherungsverfahrens nach Newton für die Kurven, bzw. Theacrinansätze 1 bis 6 unter der Annahme eines 2:1-Komplexes.

Schnittpunkt	ϵ_c	$K_c \times 10^{-6}$
1-2	557.9	1.291
1-3	607.8	1.115
1-4	643.0	1.017
1-5	734.7	0.825
1-6	768.3	0.771
2-3	643.8	0.990
2-4	665.3	0.935
2-5	756.7	0.754

Schnittpunkt	ϵ_c	$K_c \times 10^{-6}$
2-6	782.5	0.715
3-4	677.7	0.895
3-5	780.4	0.690
3-6	797.0	0.665
4-5	839.4	0.569
4-6	823.4	0.590
5-6	813.3	0.617

Unter Verwendung aller Ansätze erhält man 15 Schnittpunkte (ϵ_c , K_c ; Tab. 16). Durch Gleichgewichtung aller Schnittpunkte und Mittelwertbildung wird ein ϵ_c -Wert von $(726 \pm 87) \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ und ein K_c -Wert von $(8.29 \pm 2.09) \times 10^5 \text{ l}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$ erhalten.

4.1.2 Diskussion

Es zeigte sich, dass die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K_c mittels des spektrophotometrischen Verfahrens I (siehe 2.3.2.1.1) dort an Grenzen stösst, wo aus Gründen der geringen Löslichkeit mit niederen Substanzkonzentrationen ($< 5 \text{ mM}$) gearbeitet werden muss. Die Unzulänglichkeit des Verfahrens erkennt man allerdings nicht immer anhand eines schlechten Korrelationskoeffizienten, sondern an offensichtlich ungünstigen, weil *negativen* K_c -Werten. So wurden im Falle des Tb-CGA-Komplexes trotz eines guten Korrelationskoeffizienten ($r > 0.95$) unbrauchbare K_c - und ϵ_c -Werte erhalten. In Messerien mit hohen Konzentrationen ($> 5 \text{ mM}$) konnten bei einem tieferen Korrelationskoeffizienten ($r = 0.88$; Tph-CGA-Komplex) durchaus noch glaubwürdige Werte errechnet werden. Der Grund hierfür muss in der Annahme $[B]_0 \gg [A]_0$ gesehen werden.⁴ Dies führt zur vereinfachten Gleichung (15), bzw. (16), die aber zur Auswertung von Messerien mit niederen Purinalkaloidkonzentrationen nicht geeignet ist.

Einer der Vorzüge von Verfahren II ist, dass diese Vereinfachung nicht gemacht wurde und somit auch eine Messerie ausgewertet werden kann, deren kleinstes $[B]_0$ nur 10mal grösser ist als $[A]_0$. Die messtechnischen Schwierigkeiten, bedingt durch niedere Konzentrationen und den daraus resultierenden sehr kleinen Absorptionen (< 0.1), könnten durch die Verwendung von Küvetten mit grösserer Schichtdicke (z.B. 4 cm) umgangen werden. Ein weiterer Vorteil von Verfahren II ist die Möglichkeit einer Beurteilung der Datentripel ($A(\lambda)$, $[PA]_0$, $[CGA]_0$) bezüglich der Einwäge- und Messgenauigkeit mit Hilfe der "Geraden" und deren Schnittpunkte. Datentripel, bzw. die entsprechenden "Geraden", deren graphisch ermittelte Schnittpunkte weit ab vom "Ballungszentrum" zu liegen kamen, wurden in der rechnerischen Schnittpunktbestimmung und anschliessenden Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung nicht berücksichtigt. Die mit Verfahren II erhaltenen Resultate bieten eine sichere Basis für weitere Berechnungen und Diskussionen.

Aus der Literatur sind nur für den Co-CGA-Komplex K_c -Werte verfügbar: SONDHEIMER et al. (1960) bestimmten bei 25°C nach dem spektrophotometrischen Verfahren I ein K_c von $41 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$, nach Verfahren II ein solches von $44 \pm 4 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$ und bei 30°C mit der Verteilungsmethode ein K_c von $55 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$. Diese Werte zeigen gute Übereinstimmung mit dem gemessenen K_c -Wert von $47.3 \pm 9.5 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$, weshalb dieser in allen kommenden Berechnungen Verwendung findet.

Bei einem Vergleich aller K_c -Werte (Tab. 17) fällt auf, dass diejenigen der Dimethylxanthin-CGA-Komplexe signifikant kleiner sind. Das Fehlen einer dritten Methylgruppe vermindert den lipophilen Charakter der Moleküle, was sich ungünstiger auf die Stabilität des hydrophoben π -Elektronen-Komplexes auswirkt. Einzig bei der

⁴ $[A]_0$ = Anfangskonzentration der Chlorogensäure, $[B]_0$ = Anfangskonzentration des Purinalkaloids

Tabelle 17: Gleichgewichtskonstanten K_c , Extinktionskoeffizienten ϵ_C (354 nm) und molare, freie Enthalpien ΔG_r^o der verschiedenen Purinalkaloid-CGA-Komplexe gemessen bei 25°C. $\Delta G_r^o = -R \cdot T \cdot \ln K_c$; n = Anzahl gültiger Schnittpunkte, bzw. Stichprobengröße.

CGA komplexiert mit	nach Verfahren II		n	Komplex (PA:CGA)	ΔG_r^o [kJ·mol ⁻¹]
	K_c	ϵ_C			
Coffein	47.3 ± 9.5	3960 ± 340	10	1:1	-9.56
Theobromin	34.0 ± 8.8	2660 ± 650	3	1:1	-8.74
Paraxanthin	23.2 ± 2.4	4180 ± 330	6	1:1	-7.79
Theophyllin	25.9 ± 7.2	4020 ± 930	6	1:1	-8.06
Theacrin	(8.29 ± 2.09) × 10 ⁵	726 ± 87	15	2:1	-33.7

Theacrin-Messerie konnten mit den beiden Verfahren keine gültigen Werte erhalten werden, worauf die Bestimmung von K_c unter Annahme eines 2:1-Komplexes erfolgte (Verfahren III, siehe 2.3.2.1.2). Aufgrund relativ geringer Standardabweichungen von 12% für ϵ_C und 25% für K_c darf die Existenz eines 2:1-Komplexes in Betracht gezogen werden. Die Berechnung der molaren, freien Enthalpie zeigt, dass für jedes angelagerte Theacrinmolekül durchschnittlich 16.9 kJ·mol⁻¹ frei werden, was deutlich über demjenigen von Coffein liegt. Theacrin erweist sich somit im Rahmen der untersuchten Purinalkaloide als stärkster Komplexor für Chlorogensäure.

Abbildung 5: Prozentuale komplexierte Anteile von Coffein, Theobromin und Theacrin in Abhängigkeit der CGA-Konzentration bei 25°C. Jede Kurve gilt für eine bestimmte Konzentration (mmol/l), die aus dem Gehalt des Purinalkaloids (mg/g TG; in Klammern) berechnet wurde: 1 Co, 25 (11); 2 Co, 40 (18); 3 Tb, 1.5 (0.62); 4 Tb in Samen, 60 (13); 5 The, 10 (5); 6 The, 15 (30). Weitere Erklärungen werden im Text gegeben.

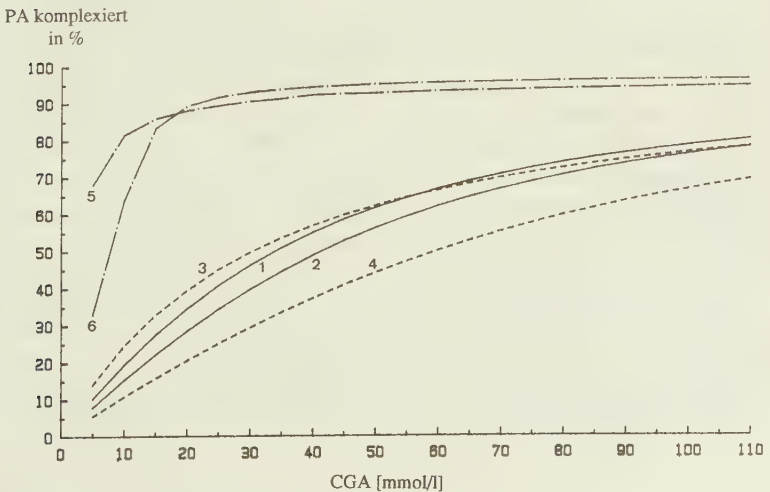
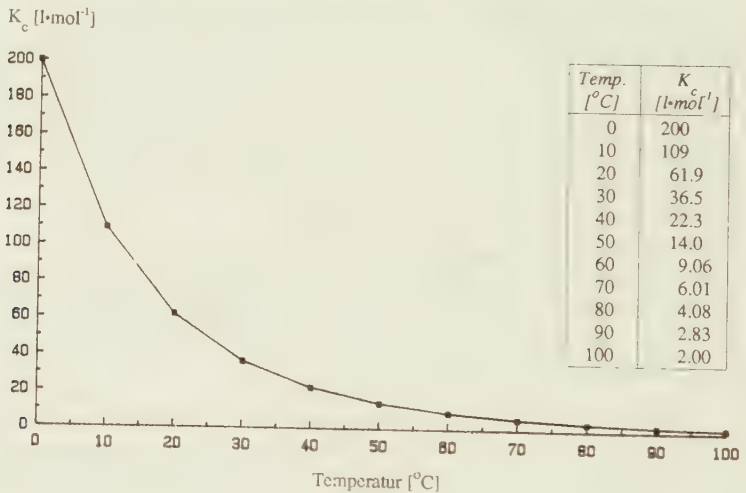




Abbildung 6: Komplexierungskonstante K_c des Coffein-Chlorogensäure-Komplexes in Abhängigkeit der Temperatur.



Umgebung die Komplexbildung. HORMAN und VIANI (1971) schätzten ohne Kenntnis von K_c (50°C), dass in einem Kaffeegetränk etwa 1% des Coffeins und 6% der CGA in komplexierter Form vorliegen, was zumindest grössenordnungsmässig mit der eigenen Berechnung übereinstimmt.

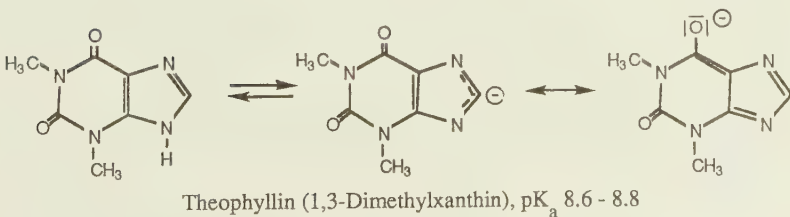
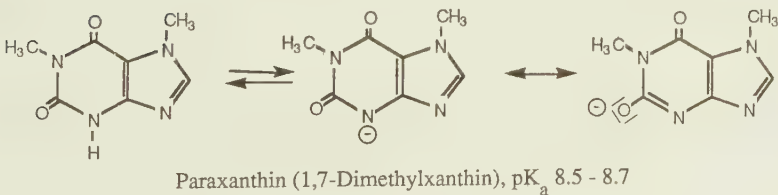
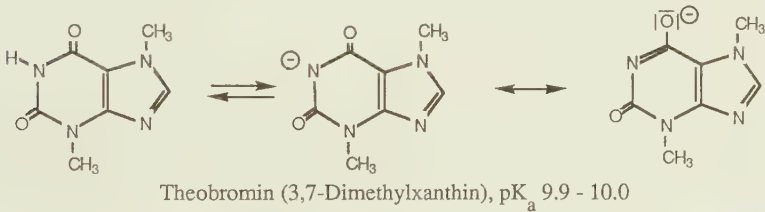
Aus Abbildung 6 ist ersichtlich, wie K_c mit sinkender Temperatur exponentiell ansteigt, d.h. die Komplexreaktion verläuft vollständiger. Dieser Mechanismus verhindert das Auskristallisieren von Coffein und CGA, wenn deren Löslichkeiten bei fallender Temperatur abnehmen. Selbstverständlich muss in dieser Betrachtung auch die Löslichkeit des Co-CGA-Komplexes berücksichtigt werden, doch ist darüber leider nichts in der Literatur zu finden.

Auf den freien, verfügbaren Anteil an Coffein und CGA, und den sich bildenden Komplex *in situ* wird auf Kapitel 4.2.3 verwiesen.

4.1.2.3 Der Einfluss des pH auf die Komplexreaktion

Aus Untersuchungen von CAVALIERI et al. (1954) im UV-Bereich ist bekannt, dass Coffein im pH-Bereich von 2 - 14 keine Veränderungen des Absorptionsspektrums zeigt. Daraus kann geschlossen werden, dass die Struktur des Coffeins unverändert bleibt. Erst bei pH 0 zeigt das Absorptionsspektrum Modifikationen, weil ein Proton angelagert wird. SONDIHEIMER et al. (1961) stellten mit Hilfe der semiquantitativen Verteilungsmethode fest, dass der Verteilungskoeffizient von Coffein in einem 2-Phasen-System, bestehend aus Wasser und Chloroform, konstant bleibt, solange nicht pH 0 erreicht wird. Einen Einfluss des sich verändernden pH auf die Komplexbildung kann demzufolge für Coffein ausgeschlossen werden. Die Dimethylxanthine Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin zeigen im basischen Bereich ($> \text{pH } 7$) eine Dissoziation des Protons am nicht-methylierten Stickstoffatom und liegen in der Folge in ionischer Form mit negativer Ladung am 2'- oder 6'-Sauerstoffatom vor (Abb. 7).

Abbildung 7: Strukturformeln der Dimethylxanthine mit assoziiertem und dissoziiertem Proton und dem dazugehörigen pK_a -Wert (modifiziert nach CAVALIERI et al. 1954).



Chlorogensäure mit einem pK_a von 2.66 (The Merck Index 1968) scheint eher für eine pH-abhängige Komplexbildung in Frage zu kommen. Tatsächlich aber, wird keine Änderung im fraglichen Bereich festgestellt. Es spielt ebenfalls keine Rolle, ob das Salz der Säure oder die freie Säure selbst in den Versuchsansatz gegeben wird (SONDHEIMER et al. 1961). Erst oberhalb von pH 6 wird ein markanter Abfall der Komplexbildung festgestellt, was mit der Deprotonierung der Hydroxylgruppen des Kaffeesäurerestes erklärt wird (SONDHEIMER et al. 1961). Bei pflanzlichen Zellsäften liegt der pH unterhalb dieses Wertes, da sie meist organische Säuren, bzw. deren Salze enthalten (STRASBURGER et al. 1983). Der pH des Cytoplasmas hingegen liegt im Bereich von 7.2 - 7.6 (KURKDJIAN et al. 1985). Es muss also angenommen werden, dass die Komplexbildung im Cytoplasma eingeschränkt wird, bzw. mit den ermittelten Gleichgewichtskonstanten nur in der Vakuole relevant ist. Die spektrophotometrischen Messungen wurden bei pH 4.1 - 5.0 durchgeführt.

4.2 Auswaschversuche mit Blattscheiben

Dieser Versuchsteil beschäftigt sich mit dem Vorkommen des Coffein-Chlorogensäure-Komplexes *in situ*. Zu diesem Zweck wurden *Auswaschversuche* mit ausgestanzten Blattscheiben 2jähriger Versuchspflanzen durchgeführt. Es wurde davon ausgegangen, dass Coffein nicht vollständig aus den Blattscheiben ins Medium austreten kann, *falls* es durch die Chlorogensäure komplexiert wird. Der Einfachheit halber wurde angenommen, dass beide Komponenten gelöst sind und sich zu Beginn des Experiments in einer mit Wasser gefüllten "Membranblase" (= idealisierte Zelle) befinden. Weder Zellwand und Organellen, noch Cytosol und Vakuole wurden in diesem Modell als Kompartimente berücksichtigt. Ferner wurde postuliert, dass CGA nicht durch die intakte Zellmembran diffundieren kann und somit auch nicht im angrenzenden Medium zu finden ist.

Aufgrund des Modells ergaben sich Fragen, die vor den eigentlichen Auswaschversuchen beantwortet werden mussten:

1. In welchen Mengen liegt CGA in Blättern von *Coffea arabica* vor, d.h. erhält man unter Beiziehung des obigen Modells CGA-Konzentrationen, welche eine erhebliche Komplexierung des Coffeins bewirken, die mittels der Auswaschversuche messbar wäre?
2. Werden für den CGA- und Coffeingehalt, sowie für das TG/FG-Verhältnis innerhalb eines Blattpaares vergleichbare Werte gefunden. Wenn ja, so können beide Blätter für die Auswaschung und die Bestimmung von TG, FG, CGA und Coffein benutzt werden.
3. Kann CGA aus Blattscheiben wirklich nicht ausgewaschen werden?
4. Beeinflusst die Blattscheibengröße und die Temperatur die Ergebnisse der Auswaschversuche?

Im Anschluss daran wurden diejenigen Versuche angegangen, die Aufschluss über die Existenz des Coffein-Chlorogensäure-Komplexes *in situ* geben konnten. Dabei waren die folgenden Fragen von Interesse:

1. Weisen die Auswaschkurven für Coffein allgemeingültige Merkmale auf?
2. Tritt nach einer gewissen Auswaschdauer eine Angleichung der Coffeinkonzentration des "Blattscheibeninnern" an diejenige des Auswaschmediums auf?

Bei der Bearbeitung aller Fragen wurde das Alter, bzw. der entwicklungsphysiologische Zustand eines jeden Blattes miteinbezogen.

4.2.1 Chlorogensäure in Kaffeeblättern

Die Untersuchung von Blattpaaren des selben Seitenzweiges zeigte, dass sämtliche Blätter in bedeutendem Masse CGA enthalten. Klare Unterschiede treten in Abhängigkeit des blattphysiologischen Alters, aber auch *innerhalb* der Blattpaare auf (Abb. 8). Wird der CGA-Gehalt als relative Menge, wie "mg/g TG" oder "mmol/l Wasseranteil" angegeben, ist zu bedenken, dass die von Blatt zu Blatt variierenden TG/FG-Verhältnisse ebenfalls in diese Grössen einfließen. Als Folge der festgestellten "Individualität" wurde sämtliches Material für die Auswaschung und Analyse eines Versuches vom selben Blatt gewonnen. War dies nicht möglich, wurden die Werte der verwendeten Blätter gemittelt.

Ungeachtet der Variationsbreite können folgende Trends erkannt werden (Abb. 8): Der TG-Anteil nimmt von der 3. zur 6. Woche deutlich zu, bleibt bis zur 14. Woche konstant, um abschliessend nochmals leicht anzusteigen. Der CGA-Gehalt verdoppelt sich von der 3. zur 6. Woche, um nach weiteren 8 Wochen den Maximalwert von rund 50 mg/g TG zu erreichen, was immerhin dem 4- bis 6fachen Anfangswert entspricht. Berechnet man unter Berücksichtigung des jeweiligen Wasseranteils die CGA-Konzentrationen, so werden mit zunehmendem Alter Werte zwischen 6.3 und 66.3 mmol/l (Minimal- und Maximalwert aus *Serie A*) erhalten. Zu beachten ist, dass der altersbedingte Anstieg des TG-Anteils massgeblich zu Erhöhung der Werte beiträgt. Damit gemäss unserem Modell der Komplexierungsgrad des Coffeins berechnet werden konnte, wurden die Coffeingehalte (mg/g TG) für *Serie B* bestimmt und in die entsprechenden Konzentrationen (mmol/l) umgerechnet (Tab. 18). Es wird ersichtlich, dass Coffein zu einem beachtlichen Teil als Komplex vorliegen müsste.

Tabelle 18: Prozentualer Anteil des durch CGA komplexierten Coffeins in Blättern der Serie B. Verwendet wurde Gleichung (30) mit einem K_c (25°C) von 37.8 (= 47.3 - 9.5), bzw. 56.8 (= 47.3 + 9.5) l·mol⁻¹. Die CGA- und Coffeinkonzentrationen werden als Anfangswerte $[A]_0$ und $[B]_0$ eingesetzt, womit sich nach 2.3.4 der Komplexierungsgrad berechnen lässt.

Alter [Wochen]	CGA [mmol/l]	Coffein	
		[mmol/l]	Komplexierungsgrad in %
3	10.5	21.8	19.2 - 23.4
5.5	25.3	23.6	38.1 - 45.3
8	24.5	24.2	37.0 - 44.0
11.5	45.8	28.5	53.4 - 61.4
14	56.4	34.2	58.0 - 65.8
16.5	57.9	42.1	56.4 - 63.8

In ersten Auswaschversuchen zeigte sich, dass CGA nur aus geschädigten Zellen und Geweben ins Medium austreten kann. So fand man z.B. bei ausgestanzten Blattscheiben, die, ohne gespült worden zu sein, ins Medium transferiert wurden, Mengen an CGA, die dem Gehalt aus der zerquetschten Randregion entsprachen. Oder es wurde CGA im Medium nachgewiesen, *nachdem* die Nekrose des Blattgewebes eingesetzt hatte.

Unter Berücksichtigung der temperaturabhängigen Komplexierungskonstante K_c (siehe 4.1.2.2) konnte der hypothetische Verlauf für die Konzentrationen des Co-CGA-Komplexes, der unkomplexierten CGA und des freien Coffeins mit Gleichung (30) berechnet werden (Abb. 9). Der für die Blattphysiologie relevante Temperaturbereich liegt in den tropisch/subtropischen Regionen zwischen 10°C und 40°C, wobei durchaus auch Extremwerte von 5°C oder 50°C registriert werden können. Aus den drei durchgerechneten Beispielen wird ersichtlich, dass der Verlauf der Kurven innerhalb des genannten Bereiches beinahe linear ist. Bemerkenswert ist ausserdem, dass die Coffeinkonzentration (freier Moleküle) im 3wöchigen Blatt bei 10°C deutlich höher ist (15.2 mmol/l), verglichen mit derjenigen im mittelalten und alten Blatt (B: 7.7 mmol/l; C: 10.8 mmol) und dies, obwohl die totale Coffeinkonzentration⁵ im jungen Blatt sichtlich tiefer ausfällt (Abb. 9). Bei 30°C hingegen, sind die Konzentrationen in allen drei Blättern etwa gleich hoch (14 - 19 mmol/l). Es sieht so aus, als ob der Chlorogensäure eine *regulatorische Funktion* in Bezug auf die ideale Coffeinkonzentration einer Pflanzenzelle zukommt. In welcher Weise die Zelle von dieser Art der Regulation profitiert, wird noch nicht verstanden.

⁵ Unter der totalen Coffein-, bzw. totalen CGA-Konzentration wird die Summe der freien und komplexierten Moleküle verstanden ($[A]_0$, resp. $[B]_0$; siehe 2.3.2.1.1).

Abbildung 8: Chlorogensäuregehalte und TG/FG-Verhältnisse in Abhängigkeit des Blattalters (in Wochen) und der Blätter innerhalb eines Paares.

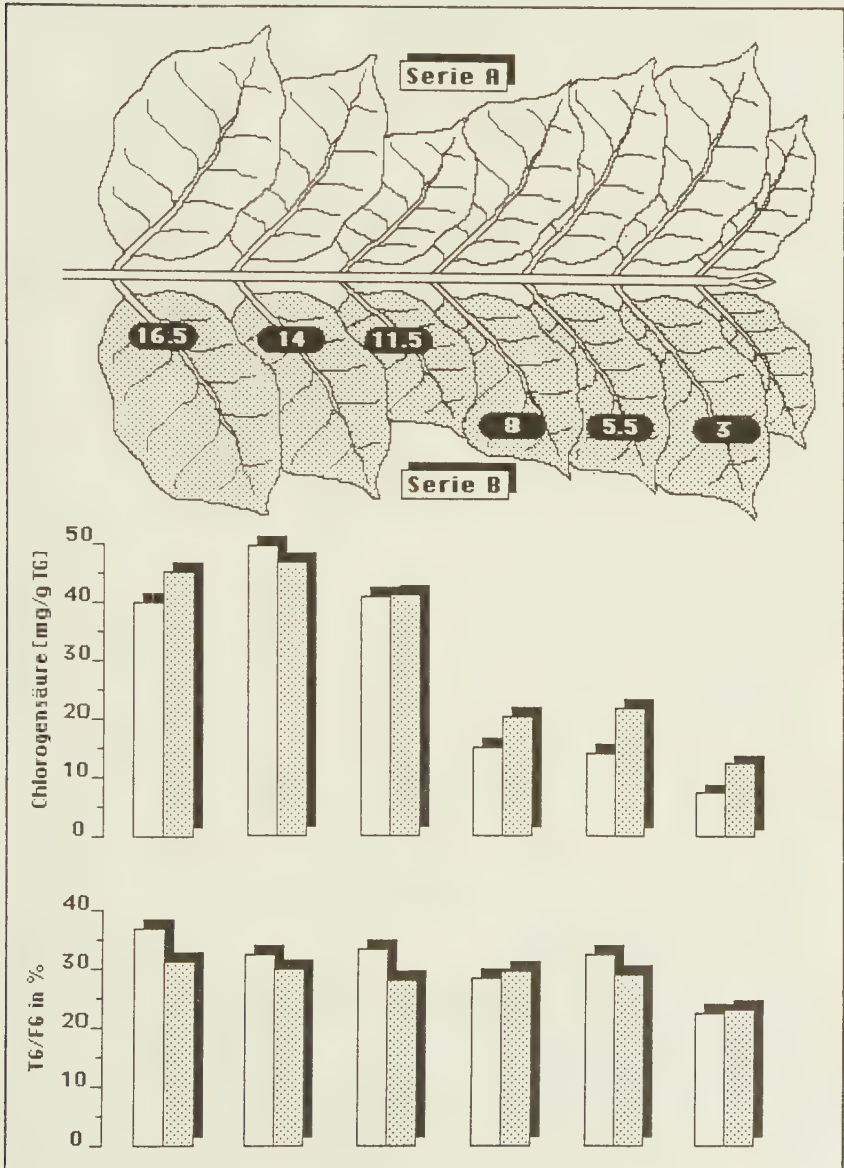
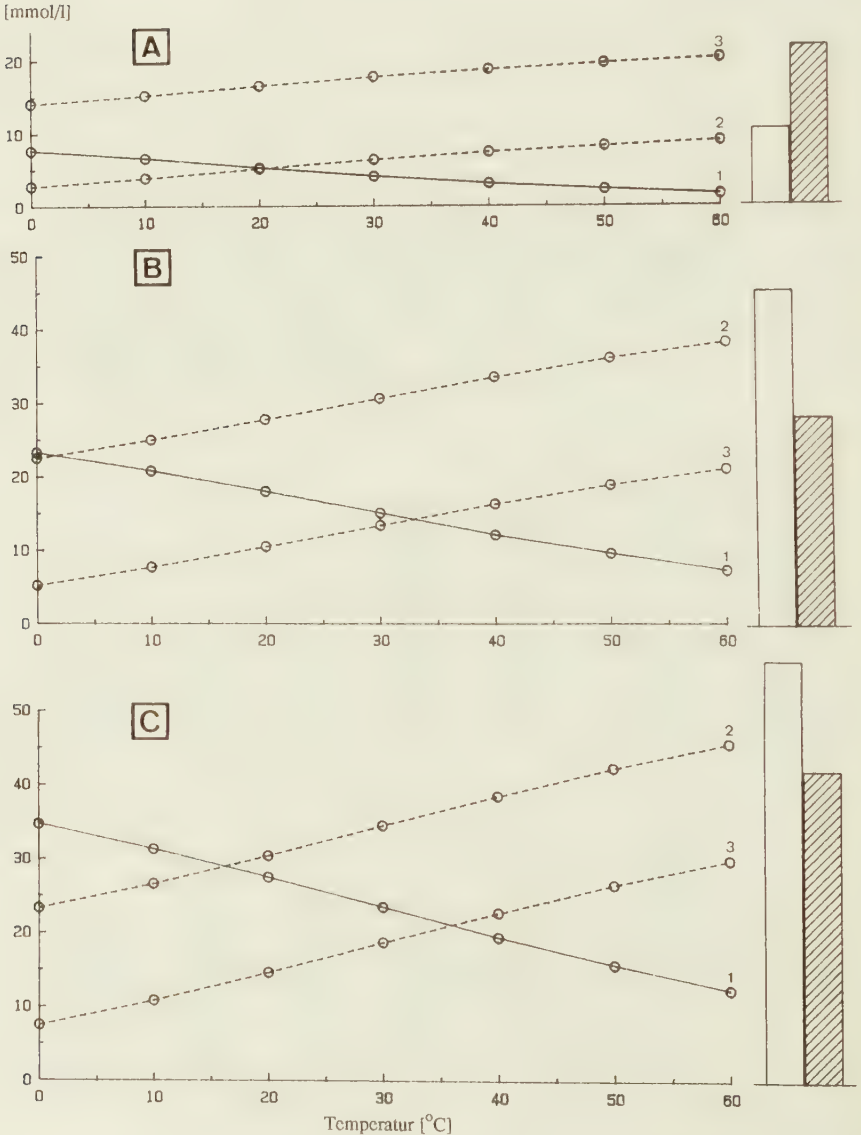


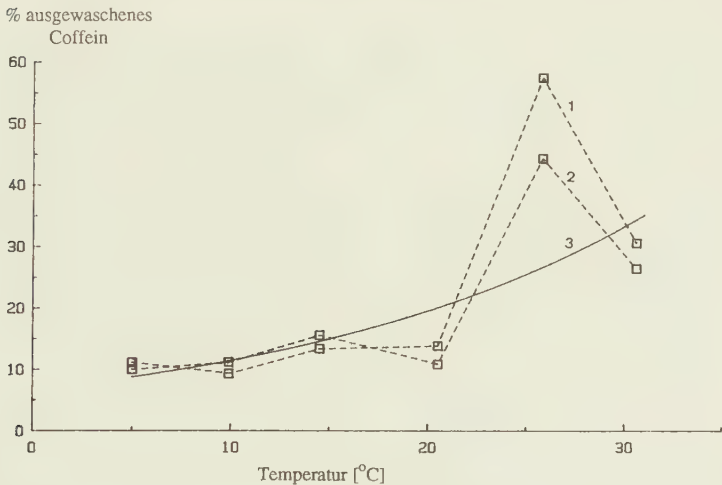
Abbildung 9: Temperaturabhängige Veränderung der Konzentrationen des Co-CGA-Komplexes (1), der freien Chlorogensäure (2) und des freien Coffeins (3). Die ungemusterten Balken geben die totale Konzentration der freien und komplexierten CGA, die schraffierten Balken diejenige des freien und komplexierten Coffeins an (nach Tab. 18). Die drei Graphiken gelten für ein 3 (A), 11.5 (B) und ein 16.5 Wochen altes Blatt (C).



4.2.2 Einfluss der Blattscheibengröße und der Temperatur

Bei Auswaschversuchen stellt sich die Frage, ob das Ergebnis von der Größe, bzw. dem Durchmesser der Blattscheiben (BS) abhängt. Unter der Annahme, dass Coffein bei vorgängig infiltrierten BS nur durch die Schnittkanten und nicht durch die Ober- oder Unterseite austreten kann, wäre eine vom Umfang/Flächen-Verhältnis (U/F) abhängige Auswaschgeschwindigkeit nicht erstaunlich. Auswaschversuche über eine Zeitspanne von 7 Stunden (siehe 2.1.3) wurden bei verschiedenen Temperaturen mit jeweils 2 BS-Gruppen unterschiedlicher U/F -Verhältnisse, aber identischer Totalfläche, durchgeführt. Da der absolute Anfangsgehalt an Coffein starken Schwankungen unterlag, wurde der prozentual ausgewaschene Anteil als Vergleichsgröße herangezogen (Abb. 10).

Abbildung 10: Prozentualer Anteil ausgewaschenen Coffeins aus Blattscheiben in Abhängigkeit der Temperatur, gemessen nach 7 Stunden. Bei jeder neuen Temperatur wurden jeweils 2 parallele Versuche mit gleichem Blattmaterial und identischer Totalfläche, aber mit unterschiedlichem U/F -Verhältnis durchgeführt (1: $\varnothing 1.5$ cm, $U/F = 2.67$; 2: $\varnothing 1.8$ cm, $U/F = 2.22$). Zur Berechnung der exponentiellen Kurve (3) wurden die Werte beider Ansätze gemittelt.



Eine Varianzanalyse der Daten zeigte, dass die prozentual ausgewaschene Coffeinmenge nicht durch das U/F -Verhältnis beeinflusst wird, wohl aber mit steigender Temperatur zunimmt ($\alpha < 1\%$). Die exponentielle Kurve in Abbildung 10 soll dies verdeutlichen. Dieser Sachverhalt ist nicht erstaunlich, da sowohl der Diffusionsvorgang durch die Membran (Diffusionskonstante D im Diffusionsgesetz von FICK zeigt Temperaturabhängigkeit!), als auch die Komplexbildung von Coffein mit CGA von der Temperatur beeinflusst wird. Im übrigen tritt auch in diesem Versuch die enorme

Variabilität des Pflanzenmaterials zu Tage, sicherlich mitbedingt durch die altersphysiologischen Verschiedenheiten der geernteten Blätter.

Ein weiterer Versuch mit 16 BS ($\varnothing$ 1 cm, $U/F = 4.00$) und 7 BS ($\varnothing$ 1.5 cm, $U/F = 2.67$) gleichen Blattmaterials, durchgeführt bei 25°C , ergab beträchtliche Unterschiede in Bezug auf den Anteil ausgewaschenen Coffeins. So gelangten beim Ansatz mit hohem U/F -Verhältnis 27% des Coffeins ins Aussenmedium, verglichen mit nur 15% beim parallelen Ansatz mit tieferem U/F -Verhältnis. Dieses Ergebnis relativiert die Aussage der Varianzanalyse dahingehend, dass zumindest mit einer limitierten Auswaschung in Abhängigkeit der BS-Randlänge gerechnet werden muss, falls die Unterschiede der U/F -Verhältnisse genügend deutlich ausfallen. In allen folgenden Experimenten wurden daher BS mit einem Durchmesser von 1 cm verwendet, um zu verhindern, dass eine Beeinträchtigung der Auswaschung durch limitierende Blattscheibenränder auftritt.

4.2.3 Kurzzeltversuche (Kompartimentierungsstudien)

4.2.3.1 Kinetik der Auswaschkurven

Die 21.5stündigen Versuche wurden bei einer Temperatur von 25°C und in Abhängigkeit des Blattalters (5, 6.5, 10 und 13 Wochen) durchgeführt. Die Auswaschkurven sind in Abbildung 11 dargestellt. Wie aus dieser Darstellung hervorgeht, zeigen die Auswaschkurven der 5 und 6.5 Wochen alten Blätter einen beinahe gleichartigen Verlauf. Die Analyse der Kurven erfolgte mittels der *Peeling-off-Methode* nach GOLD (1977) und beinhaltet eine sogenannte *Kompartimentierungsanalyse*, d.h. es wird untersucht, ob das austretende Coffein aus verschiedenen Kompartimenten mit unterschiedlichen Diffusionswiderständen her stammt (siehe 2.4). Das Ergebnis der Analyse ergibt einen aus zwei exponentiellen Gliedern bestehenden Ausdruck, der die experimentell erhaltene Auswaschkurve mit genügender Genauigkeit zu beschreiben vermag. In Tabelle 19 findet man die Parameter, die in Gleichung (33) eingesetzt den Verlauf des austretenden Coffeins aus der "Sicht" des Gewebes (Blattscheiben) in absoluten Werten beschreiben.

In BS der vier Alterskategorien konnten jeweils 2 "Coffeinpools" identifiziert werden. In allen Fällen existiert ein *langsam auswaschbarer* Pool ($N_{1,0}$) und ein *kleiner, schnell auswaschbarer* Pool ($N_{2,0}$), der 10% des gesamten Coffeingehaltes repräsentiert. Die beiden Pools sind aufgrund des k_2/k_1 -Verhältnisses deutlich voneinander unterscheidbar (siehe Tab. 19). Eine anschauliche Grösse für das Ausfliessen eines Pools ist seine Halbwertszeit. Sie beträgt für den kleinen Pool $N_{2,0}$ zwischen 1 h 5 min und 1 h 30 min, was bedeutet, dass dieser nach 21.5 h - der Zeitpunkt der letzten Messung - schon längst vollständig entleert ist. Der grosse Pool $N_{1,0}$ beinhaltet in *Abhängigkeit des Blattalters* (5 - 7, 10 und 13 Wochen) nach 35, 29, bzw. 20 h nur noch die Hälfte der Ausgangsmenge.

Abbildung 11: Experimentell ermittelte Auswaschkurven von je 16 BS ($\varnothing$ 1 cm), ausgestantzt aus S (1), 6.5 (2), 10 (3) und 13 (4) Wochen alten Blättern. Der 100%-Wert setzt sich zusammen aus dem Coffein-Total der Blattscheiben, abzüglich der während des Infiltrierens ausgetretenen Menge (sämtliche Daten sind in Appendix A aufgeführt).

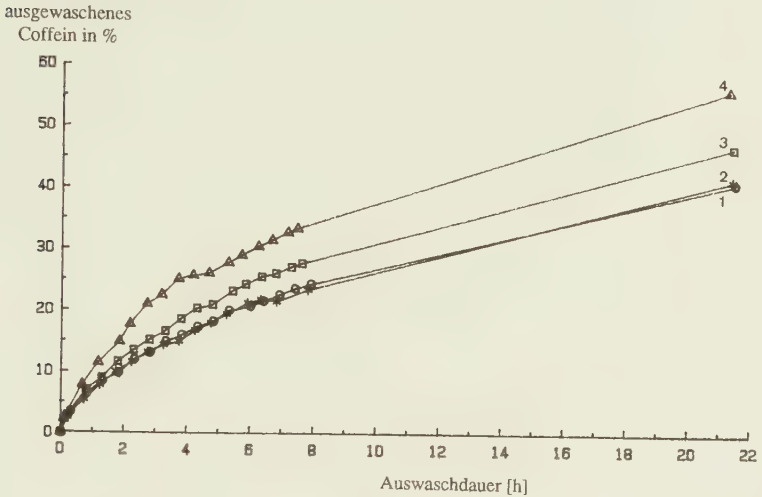


Tabelle 19: Initialwert und Diffusionskonstante von Coffein-Kompartimenten (Subpopulationen) in Blattscheiben, die durch das Peeling-off-Verfahren an Auswaschkurven erhalten wurden. Die Werte in Klammern () geben den prozentualen Coffeinanteil des 2. Kompartiments in Bezug auf die Totalmenge ($N_{1,0} + N_{2,0}$) an.

Blattalter [Wochen]	$N_{1,0}$ [μg]	$k_1 \times 10^3$ [h^{-1}]	$N_{2,0}$ [μg]		$k_2 \times 10^3$ [h^{-1}]	k_2/k_1
5/6.5	771	-20	90	(10.5%)	-642	32.1
10	811	-24	106	(11.6%)	-476	19.8
13	550	-36	756	(12.0%)	-672	18.7

4.2.3.2 Korrelation zwischen der Auswaschmenge und dem Coffein-CGA-Komplex

Nach einer Versuchsdauer von 21.5 h wurde eine Gesamtbilanz für Coffein und Chlorogensäure erstellt. Spezielle Aufmerksamkeit wurde dabei auf die Frage verwendet, inwieweit die ausgewaschene Coffeinmenge dem theoretisch errechenbaren, unkomplexierten Anteil unter Annahme des in 4.2 vorgestellten Modells entspricht (Tab. 20).

Tabelle 20: Gesamtbilanz für Coffein (Co) und Chlorogensäure (CGA) nach 21.5stündiger Auswaschdauer von 16 BS (Ø 1 cm) bei 25°C in destilliertem Wasser (Startvolumen: 32 - 33 ml) und in Abhängigkeit des pflanzenphysiologischen Blattalters. **A:** Die in der Infiltrationslösung (IFL) freigesetzten Mengen werden in µg und Prozent des Totals angegeben. Die ausgetretene CGA-Menge (in %) ist ein Indikator für den Grad der Verletzung der Blattscheiben. Für die Auswaschung wurden die Blattscheiben (BS) von der Infiltrationslösung in die Auswaschlösung (AWL) gegeben. **B:** Die Mengen in der AWL und in den BS wurden addiert und in Konzentrationen, bezogen auf den Wassergehalt der BS, umgerechnet ((1); Situation zur Zeit $t = 0$ h). Der prozentuale Anteil am Co-CGA-Komplex wurde für Coffein und CGA errechnet (2). Der nach 21.5stündiger Auswaschung in den BS erwartete, prozentuale Anteil ist unter (3) aufgeführt. Dabei wird angenommen, dass der einmal gebildete Komplex stabil ist und dass keine CGA ins Medium gelangen kann. Vergleicht man den tatsächlich in den BS gefundenen Wert (4) mit dem erwarteten (3), so kann eine gute Übereinstimmung festgestellt werden.

Die Trockengewichte (in mg) und TG/FG-Verhältnisse (in %) betrugen: **5 W:** 63.3, 25.1; **6.5 W:** 57.3, 23.9; **10 W:** 50.6, 22.0; **13 W:** 53.3, 24.5. Zur Berechnung des Komplexierungsgrades wurde ein K_c (25°C) von 47.3 l·mol⁻¹ verwendet.

	5 Wochen		6.5 Wochen		10 Wochen		13 Wochen	
	Co	CGA	Co	CGA	Co	CGA	Co	CGA
A:								
in IFL [µg]	45	39	206	82	69	117	47	104
in AWL [µg]	355	0	328	0	437	0	355	0
in BS [µg]	505	2962	457	2944	490	2378	275	2257
Total [µg]	905	3001	991	3026	996	2495	677	2361
in IFL [in %]	5.0	1.3	20.8	2.7	6.9	4.7	7.0	4.4
in AWL [in %]	39.2	0	33.1	0	43.9	0	52.4	0
in BS [in %]	55.8	98.7	46.1	97.3	49.2	95.3	40.6	95.6
Total [in %]	100	100	100	100	100	100	100	100
B:								
(1) AWL + BS [mmol/l]	23.5	44.3	22.2	45.6	26.6	37.4	19.8	38.8
(2) komplexiert in %	59.0	31.0	60.4	29.4	52.6	37.4	56.6	28.8
(3) % in BS erwartet	59.0	100	60.4	100	52.6	100	56.6	100
(4) % in BS gefunden ^a	58.7	100	58.2	100	52.9	100	43.7	100

^a Der 100%-Wert ergibt sich aus der Menge in der AWL und in den BS.

4.2.4 Langzeitversuche

Auswaschversuche von BS ($\emptyset$ 1 cm) erfolgten über längere Zeiträume (26 - 28 Tage) unter sterilen Bedingungen. Da sich die BS schwimmend im Flüssigmedium befinden, bezeichne ich dieses System als *BS-Flüssigkulturen* (siehe 4.3).

Die ursprüngliche Idee, eine Auswaschkurve über den Zeitraum von mehreren Tagen zu erhalten, die mit Hilfe des Peeling-off-Verfahrens mathematisch charakterisiert werden könne, war nicht zu verwirklichen, weil das in den BS nachweisbare Coffein nach 5 Tagen unter 5% der sich im Ansatz befindlichen Totalmenge abgesunken war (5 BS: $\emptyset$ 1 cm, Totalfläche = 3.9 cm^2 , 27°C , S^+ -Medium). In Tabelle 21 sind die in den BS enthaltenen, prozentualen Coffeinanteile nach der Zeit und verschiedenen experimentellen Bedingungen aufgeführt.

Tabelle 21: Prozentuale Coffeinanteile, die in Abhängigkeit der Kulturdauer in den BS nachgewiesen wurden. 100% entsprechen der Menge im Medium addiert mit der Menge in den BS. Der 100%-Wert ändert sich während der Kultivationsperiode, weil neues Coffein durch die Biosynthese kontinuierlich zugeführt wird. Startbedingungen: BS ($\emptyset$ 1 cm), 27°C , 30 ml/Ansatz. Die Angaben in Klammern () bezeichnen die Medien.

Experiment	Kulturdauer [Tage]						
	5	7/8	11	17	19	26	28
5 BS (S^+)	4.0	1.3	1.3	---	1.8	---	3.0 ^a
10 BS (S^+)	---	---	---	---	---	12.5 ^b	---
20 BS (S^+)	---	---	---	---	---	29.0 ^b	---
40 BS (S^+)	---	---	---	---	---	35.0 ^b	---
10 BS (oS)	---	---	5.9	3.5	---	0.6 ^b	---
10 BS (oW)	---	3.6	---	---	---	2.1 ^b	---

^a Mittelwert aus 2 Ansätzen

^b Mittelwert aus 3 Ansätzen

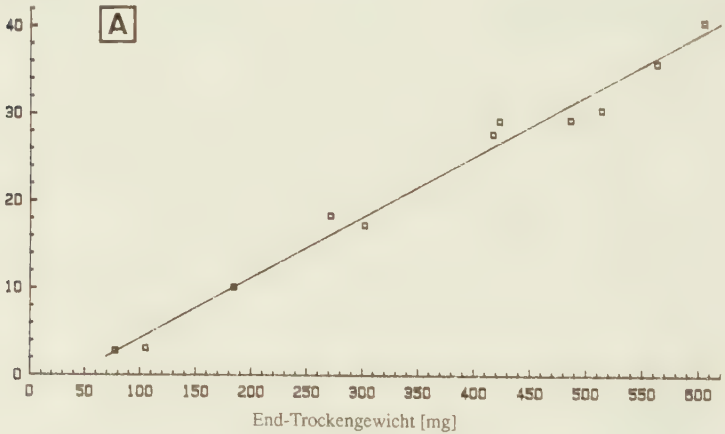
Mittels der Resultate gelangt man zur grundlegenden Feststellung, dass die Veränderung des prozentualen Coffeinanteils in BS von den experimentellen Bedingungen abhängt. Auffällig sind die noch nach 26tägiger Kulturdauer hohen Coffeinanteile in Versuchen mit 10, 20 und 40 BS und S^+ -Medium. Erwähnenswert ist ebenfalls der Verlauf des oS-Versuches: Bis zum 11. Tag bleibt der prozentuale Anteil auf 5%, um nach weiteren 15 Tagen auf 0.5 - 0.7% abzusinken. Wird das End-TG einbezogen, zeigt sich, dass (1) *der in den BS verbleibende Anteil stark mit diesem korreliert ist* und dass (2) *die Korrelation für jedes Medium anders lautet* (Abb. 12). So ist festzustellen, dass beim S^+ -Medium der Anteil des sich im Gewebe befindlichen Coffeins pro 100 mg zusätzlich erreichten End-Trockengewichtes um 6.9% zunimmt. BS-Flüssigkulturen ohne Wuchshormone (oW-Medium) zeigen bei höherem End-TG eine Abnahme (!) des Coffeinanteils (-1% / 100 mg TG).

Abbildung 12: Ermittelte Korrelationen zwischen End-TG und dem in den BS verbliebenen prozentualen Coffeinanteil am Ende der Kulturdauer. 100% ergeben sich aus dem Anteil in den BS und dem Anteil im Medium. A: Sämtliche Daten aus Versuchen mit S^+ -Medium, durchgeführt mit 5 BS (28 Tage), 10, 20 und 40 BS (26 Tage). B: oW-Versuche mit 10 BS (26 Tage). Die Korrelationen lauten wie folgt:

$$S^+: Y = 0.069 X - 2.63; n = 11, r = 0.9914$$

$$oW: Y = -0.010 X + 3.65; n = 3, r = -0.8878$$

Coffeinanteil
der BS in %



Coffeinanteil
der BS in %

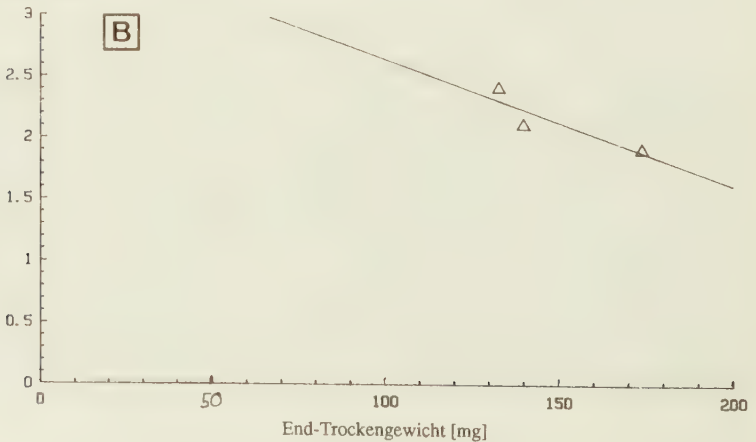


Tabelle 22: Quantitative Änderung der Chlorogensäure (CGA) in verschiedenen BS-Flüssigkulturen (pH5.5: S⁺ mit MES-Puffer; oS: S⁺ ohne Saccharose; oW: S⁺ ohne Wuchshormone; je 10 BS/ca. 30 ml Medium) in Abhängigkeit der Zeit.

Versuch	Kulturdauer [Tage]	TG [mg]	CGA in BS [µg]	CGA im Medium		CGA (BS + Med.) [mg/g TG]
				[µg]	[%]	
pH5.5 (S ⁺)	Start	37.3 ^b	2210 ^b	---	---	57.0 ^b
	2	---	---	8.7	0.5 ^c	---
	8	---	---	0	0	---
	14	117	1800	0	0	15.4
	20	---	---	0	0	---
	26	199 ^b	1125 ^b	91.7 ^b	6.4 ^b	5.4 ^b
oW	Start	46.0 ^a	2260 ^a	---	---	49.9 ^a
	5	61.0	1580	20.4	1.3	26.2
	11	93.2	1840	7.4	0.4	19.8
	14	103	1220	3.5	0.3	11.8
	20	163	1660	0	0	10.2
	26	165	1680	0	0	10.2
oS	Start	44.9 ^a	2590 ^a	---	---	57.7 ^a
	5	43.1	995	33.7	3.3	23.9
	11	43.1	896	3.5	1.1	21.0
	14	40.6	709	4.2	0.6	17.6
	20	40.9	398	173.2	30.3	14.0
	23	36.4	10.8	151.1	93.4	4.4

^a Mittelwert aus 5 Ansätzen

^b Mittelwert aus 3 Ansätzen

^c geschätzter Wert

4.2.4.1 Chlorogensäure in Blattschelben und Medium

Da in den Kurzzeitversuchen ein enger Zusammenhang zwischen ausgewaschenem Coffein und dem CGA-Gehalt, bzw. der dadurch bedingten Komplexbildung festgestellt werden konnte, interessierte die quantitative Entwicklung der CGA über eine längere Kulturdauer, zumal der noch in den BS vorhandene Coffeinanteil als gering bezeichnet werden muss.

Im "Standard"-Medium (S⁺), das mit MES-Puffer auf einen pH von 5.5 eingestellt worden war, findet man zu Beginn der Kultur Spuren von CGA (Tab. 22), das aus den verletzten Zellen der BS-Schnittkanten ausgetreten war. Nach einer Woche ist CGA im Medium nicht mehr nachweisbar. Sie tritt erst wieder in der 4. Woche in kleinen Mengen auf. Von Interesse ist, dass die totale CGA-Menge in den BS während der Kulturdauer um 50% abnimmt und dies obwohl das TG in der gleichen Zeitspanne um 430% ansteigt, d.h. der relative CGA-Gehalt sinkt von 57 mg/g TG auf 5.4 mg/g TG.

BS im *oW*-Medium entlassen ebenfalls keine CGA ins Medium. Ihr Verhalten gleicht demjenigen im "Standard"-Medium, mit dem markanten Unterschied, dass der CGA-Verlust von 30% innerhalb der ersten 5 Tage stattfindet (Tab. 22). Im weiteren Verlauf bleibt die totale CGA-Menge konstant, obwohl auch hier eine 260%ige Zunahme des TG festgestellt wird.

BS in *oS*-Medium zeigen demgegenüber ein völlig anderes Verhalten: Die Abnahme von CGA um 60% erfolgt innerhalb der ersten 5 Tage und dauert an, bis nach 23 Tagen nur noch 0.4% (!) der Anfangsmenge in den BS zu finden sind (Tab. 22). Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass nach einer stetigen Abnahme des CGA-Gehaltes im Medium eine drastische Zunahme in der 3. Woche erfolgt, so dass nach weiteren 10 Tagen 93% der gesamten CGA dort zu finden sind. An dieser Stelle muss betont werden, dass über die gesamte Kulturdauer keine TG-Zunahme, sondern eine *Abnahme* um 20% festgestellt wurde. Die TG-Abnahme geht einher mit dem Auftreten von CGA im Medium und einer Bräunung desselben, sowie der BS. In diesem Versuch wird deutlich, dass die chlorophyllhaltigen BS spätestens nach 14 Tagen auf eine verwertbare C-Quelle - in diesem Fall Saccharose - angewiesen sind, auch wenn ihnen während 13 Stunden Licht und CO₂ (aus der Luft) zur Verfügung stehen.⁶ Als Folge der mangelnden C-Quelle greifen die Zellen auf TG-Bestandteile und unter anderem auf CGA zurück, bis es zur Nekrose kommt und die verbliebene Menge durch Aufhebung der "Membranschranken" ins Medium freigesetzt wird.

4.2.5 Diskussion

Die Untersuchungen an Blättern von *Coffea arabica* haben gezeigt, dass CGA in bedeutenden Mengen vorkommt. Die Entwicklung des CGA-Gehaltes ist dabei nicht nur vom Alter abhängig, sondern scheint noch über andere Faktoren wie z.B. Licht, Wasserverfügbarkeit, Schädlingsbefall und Düngung beeinflusst zu werden (DEL MORAL 1972). Je nach Umweltbedingung werden die Gehalte von 4 - 5% des TG in der 5. bis 10. Woche erreicht. Die Unterschiede innerhalb eines Blattpaares können dabei um 10 - 20% schwanken, die allerdings auch allfällige Messungenauigkeiten beinhalten. EL HAMIDI und WANNER (1964) konnten in "jungen" Blättern plagiotroper Triebe von *Coffea arabica* CGA-Gehalte von bis zu 57 mg/g TG⁷ nachweisen. COLONNA (1986a) fand in Blättern junger *Coffea excelsa* 7.5 mg CGA/g FG, was 25 - 30 mg/g TG entsprechen dürfte. CGA ist demnach in Mengen vorhanden, die Coffein zu einem beträchtlichen Teil

⁶ Die Frage des Saccharose-Verbrauchs wird in einem späteren Kapitel (4.3.3) angegangen.

⁷ Unter der berechtigten Annahme, dass sämtliche Angaben in der zitierten Arbeit wesentlich um den Faktor 10 zu tief sind. Dies geht aus einem Vergleich der Coffeingehalte deutlich hervor.

komplexieren könnten. Falls das Modell der "idealisierten Zelle" den Berechnungen zugrunde gelegt wird, wäre Coffein zu 19 - 66% (Tab. 18, 4.2.1) als Komplex vorhanden. Diese Meinung steht im Widerspruch zur Schlussfolgerung von EL HAMIDI und WANNER (1964), wonach "die in vitro feststellbare Bindung zwischen Kaffein und Chlorogensäure stoffwechselphysiologisch" mit grosser Wahrscheinlichkeit keine Rolle spiele und beide Komponenten vermutlich unabhängige, metabolische Wege durchlaufen. Zu dieser Aussage veranlasste sie die Beobachtung, dass die Variation der Gehalte beider Substanzen nicht gleichsinnig mit dem Blattalter verläuft: Der Maximalgehalt an CGA (mg/g TG) wird in einem früheren Entwicklungsstadium erreicht als derjenige an Coffein. Gleichverlaufende Gehalte können sehr wohl ein Indiz für Verknüpfungen im metabolischen Geschehen sein, hingegen beweist eine unterschiedliche Gehaltsentwicklung auf keinen Fall die Nicht-Existenz eines Komplexes, da die Komplexbildung alleine von der temperaturabhängigen Komplexbildungskonstanten und den *Konzentrationen* (in z.B. mol/l) der beiden Komponenten beeinflusst wird.

In einem *nicht-idealisierten* Modell ist die Komplexbildung, neben dem pH - der, wie in 4.1.2.3 gezeigt wurde, erst oberhalb von pH 6 einen negativen Einfluss hat - auch von konkurrierenden Substanzen, von Salzen und der Kompartimentierung der einzelnen Komponenten abhängig. In jedem Fall muss der Vorgang der Komplexbildung und -auflösung als ein stetes Wechselspiel zwischen chemischem Gleich- und Ungleichgewicht verstanden werden.

Die kurzen Auswaschversuche über 21.5 Stunden sollten einerseits über die Anzahl der Coffeinkompartimente Auskunft geben und andererseits eine Abhängigkeit des ausgetretenen Coffeins vom vermuteten *in vivo* Co-CGA-Komplex aufzeigen. Als erstes kann festgestellt werden, dass das Alter der zur Gewinnung der BS verwendeten Blätter einen Einfluss auf die ausgewaschene Coffeinmenge hat: BS aus jungen Blättern (5/6.5 Wochen) entlassen 40% des Purinalkaloids, solche aus 13 Wochen alten Blättern 56%. Die Peeling-off-Methode zeigt, dass jede Auswaschkurve durch das Ausfliessen aus 2 *Kompartimenten* zustande kommt, wovon das eine Kompartiment einen kleinen, schnell auswaschbaren Coffeinpool beinhaltet, während das zweite Kompartiment 90% der gesamten Coffeinmenge umfasst und nur ein langsames Ausfliessen gestattet. Mit steigendem Blattalter erhöht sich allerdings die Austrittsgeschwindigkeit des Coffeins aus dem zweiten Kompartiment um beinahe das Doppelte, was zu den schon erwähnten, höheren Werten führt. Es bleibt festzustellen, dass der kleine Pool mit Halbwertszeiten von maximal 1.5 Stunden zwischen 20% und 21% der totalen *ausgewaschenen* Coffeinmenge ausmacht.

Zur Frage der Lokalisierung der Kompartimente kann der Auswaschversuch keine Antwort geben. Trotzdem sei es erlaubt einige grundsätzliche Überlegungen anzustellen: Eine Blattscheibe kann grob in Palisadenzellen, lockeres Parenchym, Leitbündel und Leitbündelscheiden aufgeteilt werden. Die mögliche Rolle dieser Gewebe in der Biosynthese und "Zwischenlagerung" des Coffeins ist bis heute nicht bekannt. Wird angenommen, alle Gewebe verhalten sich bezüglich des Coffeins gleich, bleibt nur noch

die Möglichkeit, die beiden Kompartimente auf Zellniveau zu vermuten. Folgende Möglichkeiten bieten sich hier an: Die Zellwand (extrazellulärer Raum), das Cytosol, Plastiden und die Vakuole.

Der grosse Coffeinpool ist am ehesten in der Vakuole zu vermuten, da diese einen beträchtlichen Zellanteil ausfüllt und eine erhebliche Menge des Gewebewassers beinhaltet, was der Vorstellung der "wassergefüllten Membranblase" sehr nahe käme. Ferner wäre damit der langsame Auswaschvorgang verständlich: Jedes Coffeinmolekül müsste durch zwei Membranen (Tonoplast und Plasmalemma) und die Zellwand hindurchtreten, um durch den interzellulären Raum ins Medium zu gelangen.

Der kleinere Pool müsste sich demnach im Cytosol oder in der Zellwand befinden. Die Plastiden können unberücksichtigt bleiben, da in diesem Fall 2 bis 3 Membranen (Doppelmembranen) zu überwinden wären, was eine langsame Auswaschung zur Folge hätte. Die Möglichkeit eines Artefakt muss bei solch einem kleinen Pool ebenfalls in Betracht gezogen werden. PFRUNDER (1979) schliesst dabei die Vortäuschung des Pools⁸ durch ein direktes Austreten der Moleküle aus den durch das Ausstanzen verletzten Zellen aus. Allerdings wäre denkbar, dass sich die im Cytosol befindlichen Coffeinmolekel augenblicklich durch das Plasmalemma in die Zellwand begeben und während der anschliessenden Infiltration in den wassergefüllten, interzellulären Raum übertreten. Diese Vorstellung wird durch eine Aussage von ZIMMERMANN und KAHL (1982) untermauert: Aufgrund dessen, dass sämtliche Protoplasten eines Gewebes durch die sie umgebenden Zellwände hindurch über Plasmodesmen zu einem Ganzen, dem *Symplasten*, verbunden sind, kann eine Verwundung (z.B. Ausstanzen) des Gewebes selbst weit von der Wundfläche entfernten Zellen mitgeteilt werden. Bei diesem Ereignis wird *die Membranpermeabilität schlagartig erhöht und erhebliche Ionenfluxe bauen elektrische Potentiale auf*.

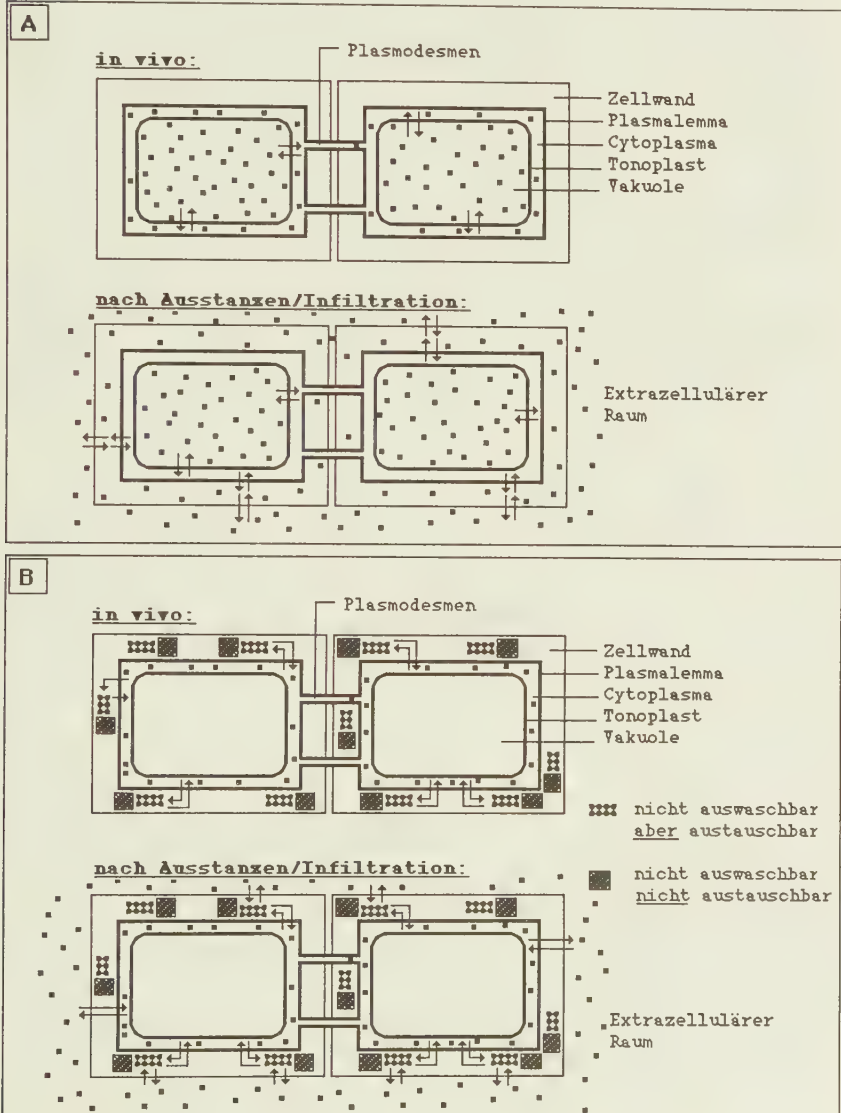
Das Modell, welches aufgrund der eigenen Untersuchungen favorisiert wird, ist in Abb. 13 schematisch dargestellt. In derselben Abbildung wird ebenfalls das Modell von PFRUNDER (1979) skizziert, welches zusätzlich zu "auswaschbar/nicht auswaschbar" das Begriffspaar "austauschbar/nicht austauschbar"⁹ miteinbezieht.

Obwohl PFRUNDER schon in seinem Modell von einem nicht auswaschbaren, *komplexierten* Coffeinanteil schrieb, wusste er nichts über die Natur des Komplexes. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Auswaschversuche unterstützen die Hypothesen, dass (1) *Coffein in vivo komplexiert wird* und (2) *Chlorogensäure der Komplexor ist*.

⁸ Der dort beschriebene Pool beinhaltet ebenfalls 10% der totalen Coffeinemenge.

⁹ Unter "nicht austauschbar" versteht man, dass Moleküle nur in einer Richtung von einem Kompartiment A in ein anderes Kompartiment B übertreten können (vgl. Einbahnstrasse in Sackgasse).

Abbildung 13: Modellvorstellungen zur Lokalisierung der Coffeinpools unter Berücksichtigung eines künstlichen Pools (klein, schnell auswaschbar), der während dem Vorgang des Austanzens und Infiltrierens gebildet wird A: neues Modell; B: altes Modell von PRFUNDER (1979).



Stärkstes Indiz hierfür erhält man aus dem Vergleich zwischen dem in BS gefundenen und dem theoretischen, in BS erwarteten, prozentualen Coffeinanteil (siehe Tab. 20). Die Differenzen betragen für 5, 6.5, 10 und 13 Wochen altes Blattmaterial 0.3, 2.2, -0.3 und 12.9 Prozenteinheiten zugunsten des erwarteten Coffeinanteils. Es sei daran erinnert, dass als Berechnungsgrundlage die CGA- und Coffeinmenge zu *Beginn* eines jeden Experimentes¹⁰ verwendet wurde, damit die gute Übereinstimmung zwischen theoretisch unkomplexiertem und ausgewaschenem Coffein gezeigt werden kann. Diese Übereinstimmung könnte bedeuten, dass die zu Beginn eines Auswaschversuches schon vorhandenen Co-CGA-Komplexe trotz der tiefen Komplexbildungskonstanten K_c nicht zerfallen, bzw. durch einen *unbekannten Mechanismus stabilisiert* werden. Die permanente Einstellung eines neuen Gleichgewichtes zwischen freiem Coffein, freier CGA und Komplex gemäss der Reaktionsgleichung fände nicht statt.

Rechnet man den Fall einer sofortigen Nachregulierung der Gleichgewichtseinstellung von Edukten und Produkt durch, werden "erwartete" Coffeinprozente erhalten, die rund 20 Prozenteinheiten unter den tatsächlich in den BS gefundenen Werten liegen. Gegen diese Anschauung spricht auch der Verlauf der Auswaschkurve zwischen der 20. und 130. Stunde (PFRUNDER 1979). Die Kurve weist innerhalb dieses Zeitintervalls Sättigungscharakter auf, deren Endwert (70%) nach 3 Tagen erreicht wird.

Tabelle 23: Vergleich der ausgewaschenen mit der errechneten, unkomplexierten Coffeinmenge in BS-Versuchen. 16 BS ($\varnothing 1$ cm), 32 - 33 ml destilliertem Wasser Startvolumen, 25°C, Auswaschdauer 21.5 h, $K_c = 47.3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ (für eine vollständige Datenzusammenstellung siehe Appendix B).

Alter [Wochen]	Coffeinanteil in %		Differenz der Prozenteinheiten
	theoret. unkomplexiert	ausgewaschen	
3	78.5	44.9	-33.6
5.5	57.9	59.2	1.3
8	59.1	63.7	4.6
11.5	41.9	40.9	-1.0
14	37.6	39.3	1.7
16.5	39.5	54.4	14.9

Zusätzliche Versuche mit BS aus 3 bis 16.5 Wochen alten Blättern zeigten ähnlich gute Resultate (Tab. 23) wie die in Tabelle 20 (B) präsentierten. Unter Einschränkung der ganz jungen (3 Wochen) und alten Blätter (13 Wochen, siehe Tab. 20; 16.5 Wochen, siehe

¹⁰ Menge in BS(t = 0) = Menge in AWL(t = 21.5) + Menge in BS(t = 21.5)

Tab. 23) kann von einer guten Reproduzierbarkeit gesprochen werden.

Das Kompartimentierungsmodell kann demnach folgendermassen ergänzt werden: In den Vakuolen der Zellen wird der Grossteil der extrahierbaren CGA vermutet. Zusammen mit dem dort befindlichen Coffein wird der Co-CGA-Komplex gebildet, der aus unbekannten Gründen nur stark verzögert auf Gleichgewichtsverschiebungen - bedingt durch das austretende Coffein - reagiert. *Dieser Komplex entspricht dem austauschbaren, aber nicht auswaschbaren Coffeinpool in der Arbeit PFRUNDERS (1979).*

Hier stellt sich nun sogleich die Frage, ob und wie CGA in die Vakuole gelangen kann. Untersuchungen von ALIBERT et al. (1977) bei *Petunia* haben gezeigt, dass die Chlorogenat-Synthase (Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinatin:Hydroxycinnamat-Transferase genannt) in den Chloroplasten lokalisiert ist. In diesem Fall wird Chlorogenat aus aktivierter Kaffeesäure (Kaffeeoyl-CoA) und Chinasäure unter Freisetzung von CoA synthetisiert (STÖCKIGT und ZENK, 1974; RHODES und WOOLVERTON, 1976; RANJEVA et al., 1977). Durch Fütterung des Präkursors [^{14}C]-L-Phenylalanin konnte in Blättern von *Coffea excelsa* ein zweiter, bevorzugter Biosyntheseweg nachgewiesen werden, welcher die Veresterung der p-Cumarsäure mit Chinasäure zu p-Cumaroyl-Chinasäure beinhaltet, woraus durch eine Hydroxylierung Kaffeeoyl-Chinasäure (CGA) entsteht (COLONNA 1986b). Zur Lokalisation der Biosynthese wurden in diesem Fall keine Experimente durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass *Isochlorogensäure*¹¹ in der Vakuole von *Mesophyllzellen* bis zur Sättigung akkumuliert wird (WERNICKE und KOHLENBACH, 1976), und zwar in Form von Einschlüssen, die an sogenannte Chlorogonoplasten¹² erinnern. Ein Transfer vom Chloroplasten hin zur Vakuole wäre eine Erklärung. Denkbar ist auch, dass das Depsid erst in der Vakuole mittels einer dort lokalisierten Transferase aus Kaffeeoyl- oder Cumaroylglucose und Chinasäure synthetisiert wird. Ein analoger Mechanismus konnte in Vakuolen von *Raphanus sativus* nachgewiesen werden, wobei p-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferula- und Sinapinsäure glucosidisch gebunden antransportiert und durch eine vakuoläre Transferase unter Abspaltung der Glucose auf Malat übertragen werden (SHARMA und STRACK, 1985; STRACK und SHARMA, 1985). Andererseits wurde in allen Polysaccharid-Fractionen der Hemicellulose, gewonnen aus Blättern von *Coffea arabica*, eine phenolische Komponente nachgewiesen, die höchstwahrscheinlich durch die Hydrolyse von CGA freigesetzt wurde (CECY und CORREA, 1984). CGA kommt folglich sowohl in der Vakuole, als auch in der Zellwand vor, wobei weder für den einen noch den andern Fall quantitative Angaben gemacht wurden. Der durch PFRUNDER (1979) festgestellte, weder auswasch- noch austauschbare Coffeinpool könnte demnach als stabilisierter

¹¹ Di-Kaffeeoyl-Chinasäure; Nomenklatur nach CLIFFORD (1979). Nach zweidimensionaler Auftrennung über Dünnschicht konnte in äthanolischen Extrakten aus Mesophyllzellen nur Isochlorogensäure gefunden werden. Mit wässrigen Extrakten nach HABERMANN (1967) wurden auch Spuren von CGA nachgewiesen.

¹² Vermutete Speicherform der Chlorogensäuren (POLITIS 1965), bzw. Entmischungsaggregate, die ein Entmischungsprodukt phenolischer Inhaltsstoffe darstellen (BOLAY 1960).

Co-CGA-Komplex mit Sitz in der Zellwand verstanden werden.

MATILE et al. (1970) untersuchten die Akkumulation von Sanguinarin in Vakuolen von *Chelidonium*. Sie postulierten zusätzlich zum Mechanismus zur Ionenfalle eine *Komplexierung durch phenolische Verbindungen*. In der Arbeit von JANS (1973) konnte unter anderem die Fällung von Sanguinarin mit Kaffeesäure *in vitro* gezeigt werden. Als hauptsächlicher Komplexor der Alkaloide in Vakuolen von *Chelidonium* wurde allerdings die Chelidonsäure erkannt. RENAUDIN (1981) und RENAUDIN und GUERN (1982) stellten in ihren Untersuchungen über die Aufnahme von Indolalkaloiden in Zellkulturen von *Catharanthus roseus* fest, dass ebenfalls eine Akkumulation nach dem Prinzip der Ionenfalle stattfindet. Da die Indolalkaloide in einem höheren Mass angereichert wurden, als dies gemäss der pH-Differenz zwischen Zellsaft und Medium erwartet worden wäre, wird eine Bindung, bzw. Komplexierung an eine noch unbekannte Substanz vermutet. Wie in 4.1.2.3 schon hervorgehoben wurde, unterliegt Coffein im pH-Bereich von 2 - 14 keinen Ladungsänderungen, womit die Anreicherung in der Vakuole *nicht* nach dem Prinzip der Ionenfalle funktionieren kann. Als Hauptprinzip der Coffeinakkumulation in Vakuolen wurde in der vorliegenden Arbeit vielmehr die *Komplexierung* durch CGA erkannt. Die Diskrepanz zwischen ausgewaschenem und auswaschbarem Coffein bei 3wöchigen Blättern (Tab. 23) könnte durch weitere vorhandene, phenolische und komplexierende Komponenten erklärt werden. Demgegenüber könnte der zu hoch ausgefallene Coffeinanteil bei 16.5 Wochen alten Blättern (Tab. 23) unter Annahme eines neu auftretenden Molekels verstanden werden, welches eine höhere Affinität zu CGA aufweist.

In den Langzeitversuchen (26 - 28 Tage) zeigte sich, dass der in den BS befindliche Coffeinanteil von den experimentellen Bedingungen, d.h. vom Medium und vom End-TG abhängt, wobei das End-TG selbst vom Medium beeinflusst wird. Dass sich letztlich keine 1:1-Verteilung des Coffeins zwischen BS-Innern und Medium einstellt, ist aus den unterschiedlichen Korrelationen zwischen End-TG und prozentualem, komplexiertem Coffeinanteil ersichtlich. Ein Zusammenhang zwischen dem in den BS zurückgehaltenen Coffein und der dort befindlichen CGA ist wahrscheinlich. Am deutlichsten kommt dies bei den Versuchen mit α S-Medium zum Ausdruck, wo CGA nach 23 Tagen zu über 93% in den BS abgebaut wird. Von der restlichen CGA lassen sich noch 7% in den nekrotischen BS und 93% im Medium nachweisen.

Während der Kultivationsperiode nimmt CGA in jedem der untersuchten Fälle mehr oder weniger drastisch ab. Gleichzeitig nimmt die Biomasse - mit Ausnahme des α S-Versuches - zu. Dies führt zu einer *Abnahme der CGA-Konzentration*¹³ und folglich zu

¹³ Ob CGA in den neu hinzukommenden Zellen synthetisiert wird, ist fraglich, zumal diese Zellen (in Kalli-ähnlichen Gebilden) kaum Chlorophyll enthalten und vermutlich keine intakten Chloroplasten besitzen. So dürfte zumindest die Biosynthese mittels chloroplastengebundener Chlorogenat-Synthase unterbunden sein. BUCKLAND und TOWNSLEY (1975) zeigten zudem bei Suspensionskulturen von *Coffea arabica*, dass die CGA-Menge (mg/g TG) während der Wachstumsphase auf Null absinkt und erst wieder kurz vor Erreichen der maximalen Biomasse zu steigen beginnt, d.h. nur ausdifferenzierte, sich nicht in der Teilung befindliche Zellen konnten CGA akkumulieren.

einer stetigen Verringerung der Komplex-Konzentration.

TAYLOR und ZUCKER (1966) konnten zeigen, dass CGA nicht als ein Endprodukt der Biosynthese phenolischer Komponenten gelten kann. Sogar in ausgewachsenen Blättern mit einem konstanten Gehalt wurde ein extensiver Umsatz des CGA-Pools festgestellt. Nach Studien von COLONNA (1986b) wird der CGA-Pool in Blättern von *Coffea excelsa* innerhalb 96 Stunden vollständig erneuert. Fehlen nun die geeigneten Präkursoren, wie Phenylalanin zur Synthese von Cumar- und Kaffeesäure oder Zucker zur Synthese von Chinasäure, so unterbleibt der Zufluss in den CGA-Pool.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *in vivo* grosse Mengen des Coffeins als Komplex mit CGA vorliegen. In sterilen Langzeitversuchen allerdings ist der Co-CGA-Komplex bald einmal vernachlässigbar, da der CGA-Pool stetig verkleinert wird. Das Verhältnis von End-TG und Mediumvolumen wird dann für die Verteilung des Coffeins ausschlaggebend.

In den folgenden Versuchen, die an einer hohen Produktivität des Coffeins und dessen möglichst guter Abgabe ins Medium orientiert sind, kann davon ausgegangen werden, dass ein verhältnismässig kleiner Anteil in den Blattscheiben zurück bleibt.

4.3 Blattscheiben in Kultur

Nachdem schon im vorangegangenen Kapitel Langzeit-BS-Flüssigkulturen erwähnt wurden, soll an dieser Stelle näher auf ihr Verhalten bezüglich TG-Entwicklung, pH-Verlauf, Osmolarität, Zuckerkonsum und Purinalkaloidproduktion eingegangen werden.

Die *Vorteile einer Kultivierung von BS* gegenüber den aus Kalli gewonnenen Zellaggregaten müssen in der beinahe unbegrenzten Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials und in der vorhandenen hohen Zelldichte gesehen werden. Die Kultivierung eines naturgegebenen Zellverbandes unterschiedlicher Gewebe, die untereinander mittels Plasmodesmen in Kontakt stehen, muss als weiterer Vorteil angeführt werden. Bei solchen *in vivo* vorkommenden Zellverbänden könnte unter geeigneten Umständen eine bedeutende Erhöhung der Alkaloidproduktion erreicht werden, was aus der Sicht der biotechnologischen Gewinnung pharmazeutisch interessanter Sekundärstoffe von grossem Nutzen wäre.

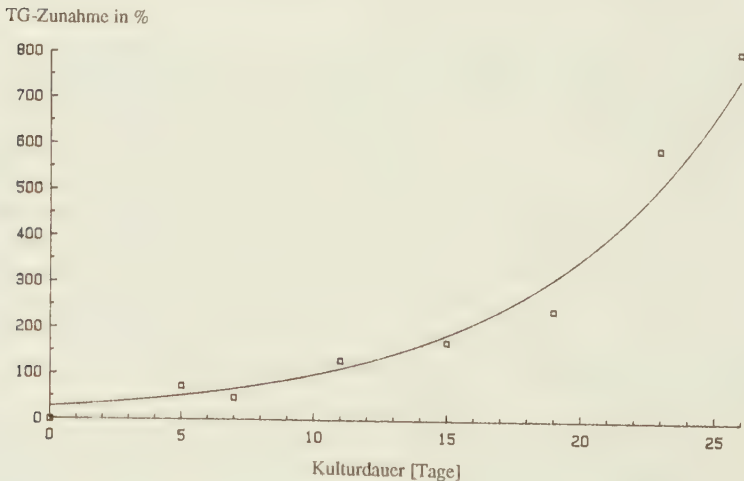
In den folgenden Versuchen wird der Frage nachgegangen, unter welchen Bedingungen die BS befähigt sind, eine maximale Alkaloidproduktion zu zeigen. Als Grundmedium diente das für Suspensionskulturen von *Coffea arabica* bestens bewährte S^+ -Medium. Variationen ergaben sich durch Weglassen der Saccharose (C-Mangel) oder der Wuchshormone und durch Hinzufügen von Puffern (pH-Stress) oder Salzen, wie KCl und NaCl (Salzstress). Den Versuchen, die Sekundärstoffproduktion in BS-Flüssigkulturen über das normale Mass hinaus durch verschiedenste Stressfaktoren zu stimulieren, ging die

Beobachtung voraus, dass kultivierte Zellen oftmals erst dann die gewünschten Stoffe bilden, wenn *Nährsalzmangel* vorliegt (KNOBLOCH und BERLIN, 1980). Daraufhin stellten FRISCHKNECHT und BAUMANN (1985) die Hypothese auf, dass die auf Wachstum optimierten Kulturmedien zur maximalen Bildung von Sekundärstoffen ungeeignet seien. Vielmehr beeinflusse das Anlegen eines Stresses *in vitro* die Neusynthese von Sekundärstoffen in positiver Weise. Tatsächlich konnten sie in Suspensionskulturen von *Coffea arabica* unter NaCl-Stress eine Verdoppelung der ins Medium abgegebenen Purinalkaloide feststellen.

4.3.1 Entwicklung der Biomasse

In S^+ -Flüssigmedium und unter einem Tag/Nacht-Rhythmus wurden BS über eine Zeitspanne von 26 Tagen in Kultur behalten. Die exponentielle Zunahme der Biomasse wurde in mehreren Ansätzen (mit je 5 BS, Ø 1 cm) gemessen (Abb. 14).

Abbildung 14: Prozentuale Zunahme der Biomasse in Flüssigkulturen von 5 BS/30 ml S^+ -Medium. Jeder Punkt entspricht einem Ansatz. Da sich das anfängliche TG jedes Ansatzes unterscheidet, wurde für die "Wachstumskurve" nicht die absolute, sondern die prozentuale TG-Zunahme verwendet. Ohne Berücksichtigung des Nullpunktes erhält man die folgende Regression: $Y = 28,21 \cdot e^{0,1258t}$, $r^2 = 0,9460$, $n = 7$.



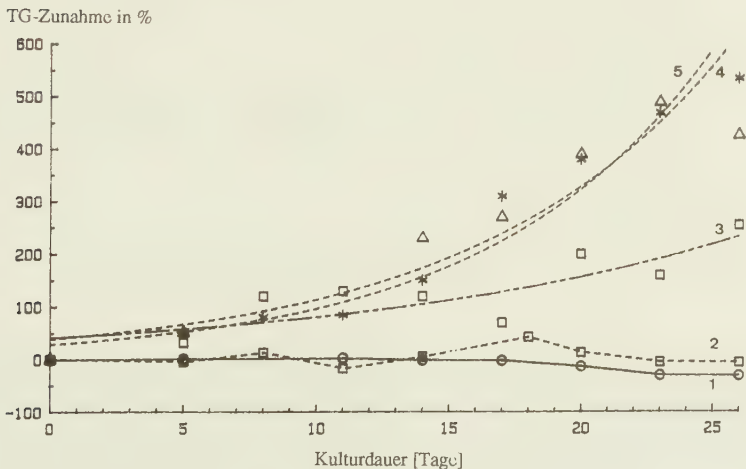
Eine Optimierung des Inokulums in Bezug auf das End-TG wurde mit Ansätzen, die 10, 20 und 40 BS auf 30 ml Medium enthielten, versucht. Nach 26tägiger Kulturdauer wurden die Trockengewichte bestimmt (Tab. 24).

Tabelle 24: Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 3 TG-Messungen nach 26tägiger Kulturdauer in S^+ -Medium.

Anzahl BS	TG [mg/BS]	TG-Zunahme in %
10	25.2 ± 6.1	897 ± 248
20	22.5 ± 2.7	847 ± 72
40	13.8 ± 1.5	460 ± 50

Der höchste absolute, wie auch prozentuale TG-Zuwachs wurde in Kulturen registriert, die 10 BS enthielten. Allerdings können die Kulturen mit 10 und 20 BS aufgrund der grossen Standardabweichung und der kleinen Stichprobengrösse ($n = 3$) nicht signifikant voneinander unterschieden werden. Deutlich zurück fielen die Ansätze mit 40 BS, weil entweder Nährsalze, Wuchshormone oder der Zucker vorzeitig aufgebraucht worden waren. Zukünftig wurden nur noch Flüssigkulturen angesetzt, die 10 BS auf 30 ml Medium enthielten.

Abbildung 15: Prozentuale Zunahme der Biomasse in Flüssigkulturen von 10 BS/30 ml Medium. Die errechneten Regressionen berücksichtigen die Nullpunkte nicht. Sämtliche Daten sind in Appendix C aufgeführt. 1: ohne Saccharose (oS); 2: pH3.5; 3: ohne Wuchshormone (oW; $Y = 41.65 \cdot e^{0.0665 \cdot t}$, $r^2 = 0.5649$, $n = 8$); 4: pH5.5 ($Y = 39.31 \cdot e^{0.1063 \cdot t}$, $r^2 = 0.9013$, $n = 6$); 5: pH7.5 ($Y = 28.90 \cdot e^{0.1208 \cdot t}$, $r^2 = 0.9567$, $n = 8$)

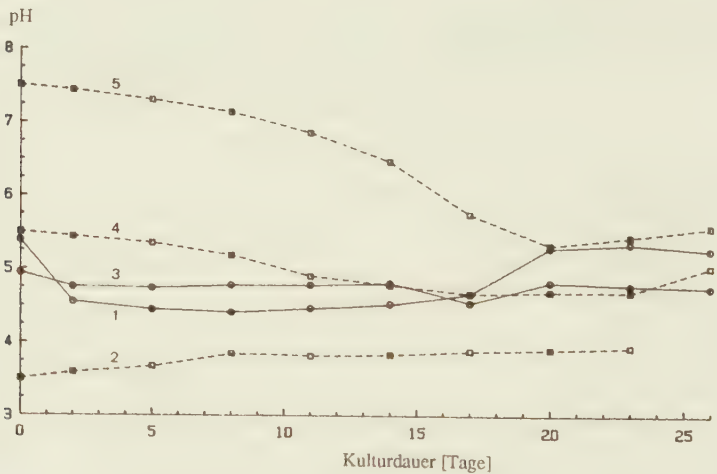


Die TG-Entwicklung der BS unter Nährstoff- und pH-Stress ist in Abbildung 15 dargestellt. Deutlich sichtbar ist die stete Abnahme der Biomasse im oS-Medium, d.h.

unter den gegebenen Umständen konnten die BS keine Photosyntheseaktivität entwickeln. Versuche ohne Wuchshormone erbrachten einen - allerdings bescheidenen - Zuwachs an Biomasse. Aus nicht bekannten Gründen ist die Entwicklung der Biomasse im *pH3.5*-Medium grossen Schwankungen unterworfen. Trotzdem ist ein leichter Anstieg um 43% bis zum 18. Tag erkennbar, gefolgt von einer Abnahme bis zur Unterschreitung des Anfangsgewichtes (siehe Appendix C). Ein tiefer pH wirkt trotz vorhandenem Zuckerangebot hemmend, bzw. führt zur Nekrose, erkennbar an der gelbbraunlichen Verfärbung des Mediums. Zwei nahezu gleich verlaufende Regressionskurven erhält man für BS in *pH5.5*- und *pH7.5*-Medium.

4.3.2 pH und Osmolarität im Medium

Abbildung 16: pH in Abhängigkeit der Kulturdauer und des Mediums. Sämtliche Daten sind in Appendix D aufgeführt. 1: ohne Saccharose; 2: *pH3.5*; 3: ohne Wuchshormone; 4: *pH5.5*; 5: *pH7.5*.

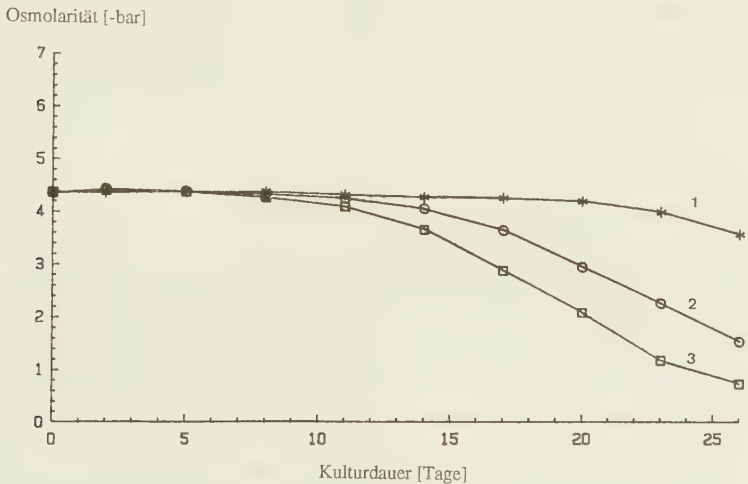


Unabhängig vom Anfangswert und den gebotenen Bedingungen bewegt sich der pH in den Bereich von 5 - 6 (Abb. 16). Am eindrucklichsten wird dies im *pH7.5*-Medium gezeigt, in welchem trotz einer Pufferung durch HEPES nach 17 Tagen ein pH von 5.7 erreicht wird. Beim Citrat-Puffer (*pH3.5*-Medium) wird trotz stetem Anstieg nie der pH-Wert 4.0 überschritten. Offensichtlich sind in diesem Fall die BS nicht imstande, genügend nachzuregulieren. Vermutlich können Protonen leichter abgegeben, bzw. Anionen (Säuren) leichter aufgenommen werden, als umgekehrt. Auf eine Darstellung der pH-Kurven von Kulturen mit 5, 10, 20 und 40 BS in S^+ -Medium wurde verzichtet, da in allen Fällen ein

ähnliches Resultat wie im *oS*-Versuch erhalten wird (siehe Appendix D). Allerdings zeigen mit Ausnahme der 40 BS enthaltenden Kulturen alle anderen Versuche keinen schnellen, drastischen Anstieg des pH, wie dies in *oS*-Kulturen beobachtet werden kann. Möglicherweise gibt ein plötzlicher pH-Anstieg einen Hinweis auf den einsetzenden nekrotischen Prozess.

Interessant ist, dass ein hoher pH die Entwicklung der Biomasse nicht zu beeinträchtigen vermag (*pH*7.5-Medium), dass aber ein niedriger pH-Wert etwa gleichbedeutend ist mit einem totalen Zuckermangel (*pH*3.5- und *oS*-Medium). Ob im letzteren Fall der pH von 3.5, der Citrat-Puffer oder die erhöhte Osmolarität (Vergl. Tab. 25) kausal mit der fehlenden Biomasseproduktion verknüpft ist, können nur weitere Versuche zeigen.

Abbildung 17: Verlauf der Osmolarität in Abhängigkeit der Kulturdauer und der Anzahl inokulierter BS in *S*⁺-Medium (30 ml). Für jeden Wert wurden Messungen von 3 Ansätzen gemittelt. 1: 10 BS; 2: 20 BS; 3: 40 BS.



Der Verlauf der Osmolarität in *S*⁺-Medium mit 10, 20 und 40 BS pro Ansatz ist in Abbildung 17 dargestellt. Es wird deutlich, dass bei grossem Inokulum und dementsprechend hohem Zucker- und Nährsalzverbrauch enorme Osmolaritätsänderungen auftreten. Die sinkende Osmolarität im Medium bewirkt eine gesteigerte Wasseraufnahme der Zellen und einen erhöhten Turgor, dem die Zellwand entgegen wirken muss. Eine Schädigung der Zellen ist nicht vollständig auszuschliessen.

Die Osmolaritätsänderung im *pH7.5*-Medium fällt ebenfalls noch recht deutlich aus. Sie kann nicht nur durch das gute Wachstum der BS und einen daraus resultierenden, hohen Zuckerverbrauch erklärt werden kann, müsste doch beim *pH5.5*-Medium eine gleichermassen drastische Änderung gemessen werden. Es bleibt anzumerken, dass in den restlichen Fällen über die gesamte Kulturdauer hinweg keine Schwankungen festgestellt wurden und darum die Anfangs- und Endwerte der Osmolarität in Tabelle 25 hinreichend aussagekräftig sind.

Tabelle 25: Osmolarität des Mediums zu Beginn und am Ende der Kulturdauer, gemessen für jeweils 10 BS/30 ml Medium. Der Anfangswert entspricht dem autoklavierten Medium. Der Endwert repräsentiert den Mittelwert aus 3 Messungen.

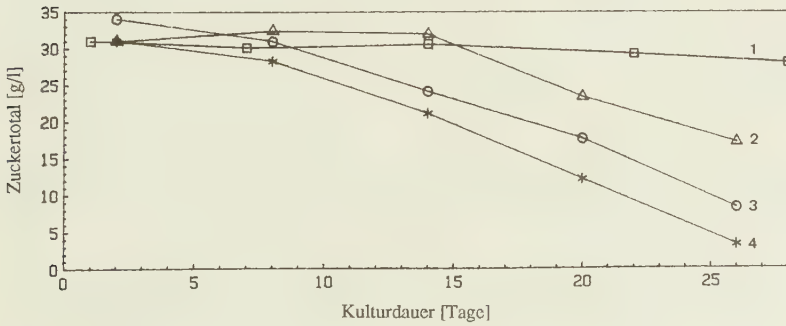
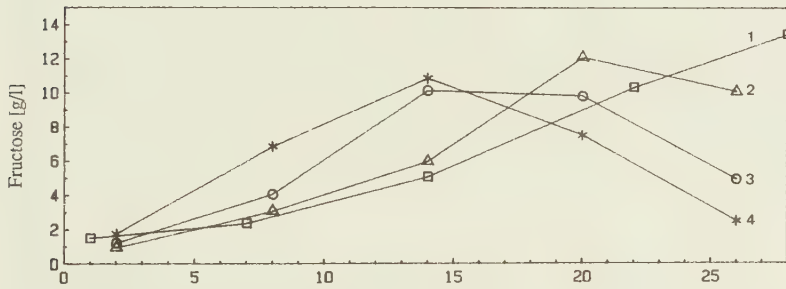
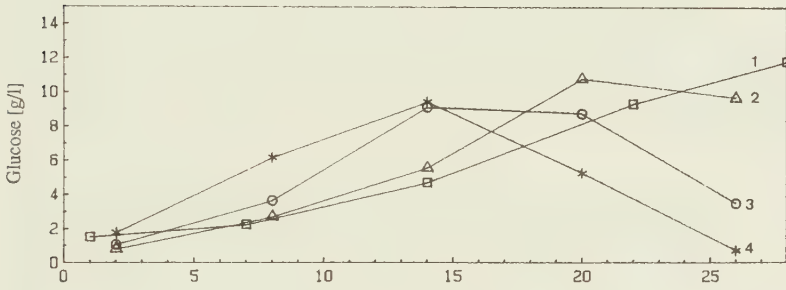
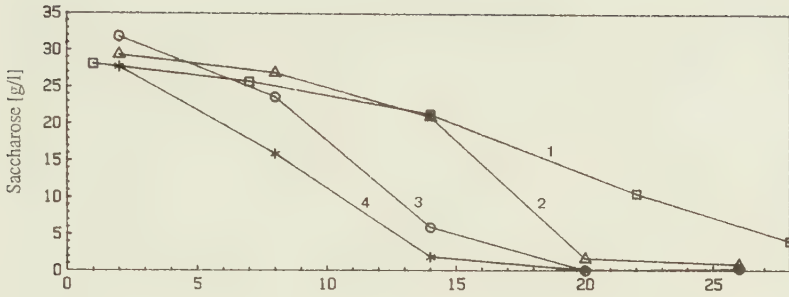
Medium	Osmolarität [bar]	
	Start	nach 26 Tagen
oS	-2.11	-2.11
oW	-4.65	-4.68
pH3.5	-6.36	-6.31 ^a
pH5.5	-5.27	-5.17
pH7.5	-5.81	-4.86

^a nach 23 Tagen

4.3.3 Der Zuckerverbrauch

In 30 ml *S*⁺-Medium, das 5, 10, 20 oder 40 BS enthielt, wurde der Abbau der Saccharose und die Bildung von Glucose und Fructose über die gesamte Kulturdauer verfolgt (Abb. 18). Da der effektive Zuckerverbrauch von Interesse war, wurden die gemessenen Glucose- und Fructose-Werte unter Berücksichtigung des sich abspaltenden H₂O in Saccharose umgerechnet und zu der im Medium nachgewiesenen Saccharosekonzentration hinzugezählt (= Zuckertotal, siehe Abb. 18, Berechnung siehe 2.2.5).

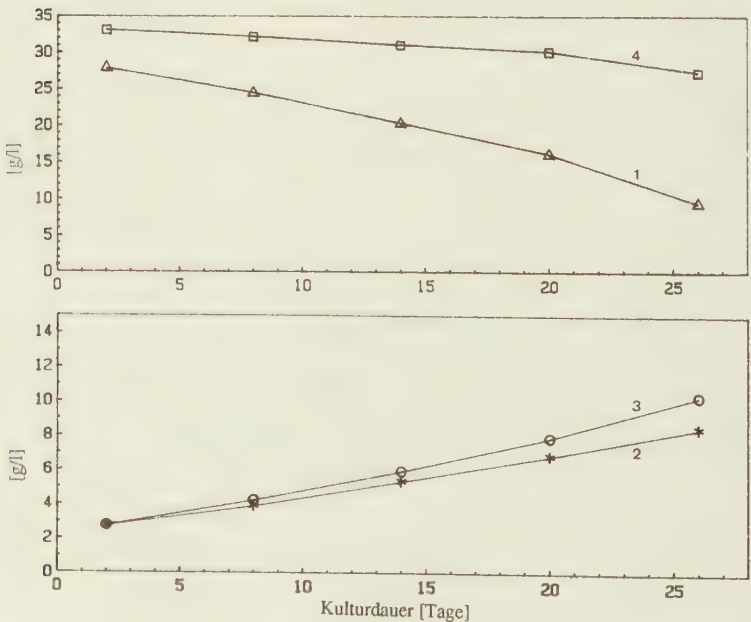
Abbildung 18: (Siehe nächste Seite) Mediumkonzentrationen von Saccharose, Glucose, Fructose und Zuckertotal in Abhängigkeit der inokulierten BS und der Kulturdauer. Alle Versuche wurden mit *S*⁺-Medium durchgeführt. Die Daten für 14 und 26, bzw. 28 Tage stellen Mittelwerte aus je 3 Ansätzen dar. Die dazugehörigen Standardabweichungen sind in Appendix E aufgeführt. **1:** 5 BS (Inokulum: 2.22 ± 0.14 g FG/l); **2:** 10 BS (Inokulum: 4.31 ± 0.05 g FG/l); **3:** 20 BS (Inokulum: 8.27 ± 0.66 g FG/l); **4:** 40 BS (Inokulum: 17.42 ± 0.30 g FG/l).



Die Resultate zeigen, dass mit steigender Anzahl inokulierter BS ein vermehrter Saccharoseabbau zu den Hydrolyseprodukten Glucose und Fructose stattfindet. Sind Saccharose und/oder Glucose und Fructose in genügend hohen Konzentrationen vorhanden, beträgt das Verhältnis von Fructose zu Glucose etwa 1.1 (siehe S^+ -Medium mit 5 und 10 BS, Appendix E). Tritt schon in der Halbzzeit der Kultur Saccharosemangel auf, gefolgt von einem sich verringernenden Angebot an Glucose und Fructose, so verschiebt sich das Fru/Glu-Verhältnis nach 1.4 (für 20 BS), bzw. 3.5 (40 BS), d.h. Glucose kann von den BS besser verwendet werden, als Fructose. Die maximale Glucose-, bzw. Fructosekonzentration mit darauffolgender Abnahme wird umso früher erreicht, je mehr BS zu Beginn eingesetzt werden. In gleicher Weise zeigt sich eine Abhängigkeit in Bezug auf die Abnahme des Zuckertotals.

Medium *ohne Saccharose* wurde ebenfalls auf mögliche biosynthetisch hergestellte und ausgeschiedene Zucker untersucht. Trotz des abnehmenden Trockengewichtes, was durch die anlaufende und Zucker-freisetzende Hydrolyse der Zellwand erklärt werden kann, wurde keiner der drei Zucker nachgewiesen.

Abbildung 19: Mediumkonzentrationen von Saccharose, Glucose, Fructose und Totalzucker in Abhängigkeit der Kulturdauer für 10 BS/30 ml oW-Medium. Jeder Punkt repräsentiert einen Mittelwert aus je einer Messung dreier Ansätze. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Appendix E aufgeführt. 1: Saccharose; 2: Glucose; 3: Fructose; 4: Totalzucker.



In Abbildung 19 ist der Verlauf der Zucker für BS im *oW*-Medium dargestellt. im Vergleich mit 10 BS kultiviert in S^+ -Medium wird deutlich, dass der Saccharoseabbau, die Glucose- und Fructosebildung und die Abnahme des Totalzuckers deutlich langsamer abläuft: 10 BS im *oW*-Medium zeigen eine ähnliche Wirkung wie 5 BS im S^+ -Medium. Das Verhältnis von Fructose zu Glucose im Medium steigt von anfänglich 1.0 auf 1.2 nach 26 Tagen, d.h. es findet eine schwache Anreicherung der Fructose gegenüber der Glucose statt. Versuche mit 10 BS in gepuffertem Medium bei pH 3.5, 5.5 und 7.5 zeigen grosse Unterschiede (Appendix E). So verbrauchten die BS in *pH3.5*-Medium gleich viel Totalzucker, wie 5 BS in S^+ -Medium. Allerdings wurde bei pH 3.5 4mal weniger Saccharose in Glucose und Fructose umgesetzt, was entweder auf eine verminderte Invertasebildung oder aber auf eine pH-bedingte, suboptimale Invertaseaktivität¹⁴ hinweist. Der Zuckerverbrauch in *pH5.5*-Medium entspricht demjenigen in S^+ -Medium mit 10 BS. Interessanterweise verschiebt sich das Fru/Glu-Verhältnis nach 1.6. Ein leicht höherer Saccharose-, Glucose- und Fructoseverbrauch wird in *pH7.5*-Medium erhalten. Das Fru/Glu-Verhältnis steigt bei diesen Kulturen auf 1.8. Offensichtlich bevorzugen BS in *gepuffertem*, leicht saurem bis leicht basischem Medium die Aufnahme von Glucose gegenüber Fructose.

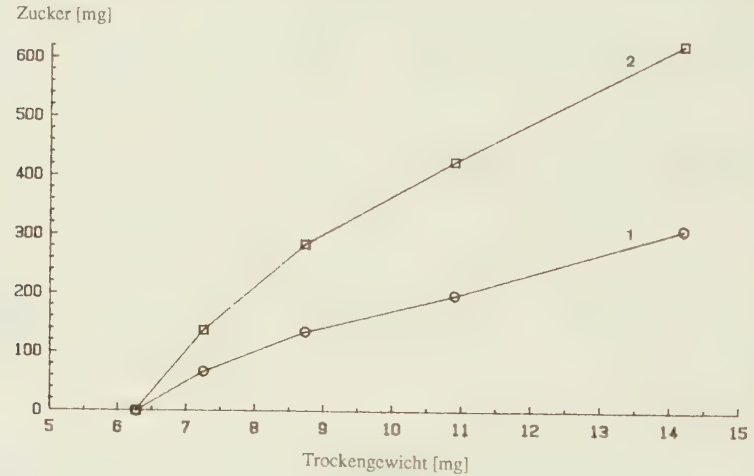
Da beim *oW*-Versuch bezüglich des Zuckerverbrauches eine genügend grosse Anzahl Daten vorhanden ist, konnte die Entwicklung der Biomasse, bzw. des Trockengewichtes der BS mit der Abnahme der Saccharose und des Totalzuckers verglichen werden (Abb. 20). Die Kurven flachen in beiden Fällen mit zunehmendem Trockengewicht ab, bis sie schliesslich eine konstante Steigung beibehalten. Für die gleiche, absolute Zunahme des Trockengewichts wird zu Beginn eine wesentlich grössere Zuckermenge benötigt als gegen Ende der Kultur. In Zahlen ausgedrückt müssen zwischen dem 2. und 8. Tag 68 mg Totalzucker (in Saccharoseeinheiten gerechnet)/mg gebildetem TG umgesetzt werden, während zwischen dem 20. und 26. Tag noch ganze 34 mg/mg TG benötigt werden. Die Beziehung zwischen Zuckerverbrauch und Trockengewichtszunahme wird erst nach etwa 2 Wochen linear.

4.3.4 Die Purinalkaloidproduktion

Da Theobromin- und Coffeinkonzentrationen im Medium schnell und einfach zu bestimmen sind und zudem der Gebrauch der biotechnologischen Masseineinheit *mg/l* für *in vitro* produzierte Stoffe (Fermentertechnologie) gebräuchlich ist, werden die Resultate in eben dieser Einheit präsentiert. Es soll dabei allerdings stets daran gedacht werden, dass das

¹⁴ Das pH-Optimum der sauren β -Fructofuranosidase ist von der verwendeten Enzymquelle abhängig und liegt in einem pH-Bereich von 4.0 - 5.3 (AP REES 1974).

Abbildung 20: Verbrauch an Totalzucker (1) und an Saccharose (2) vs. Trockengewicht in BS-Flüssigkulturen mit oW-Medium. Die Zahlenwerte sind in Appendix F aufgeführt.



Zustandekommen einer hohen und sicherlich erwünschten Stoffkonzentration abhängt vom Inokulum, Mediumvolumen, Nährstoffangebot, einsetzenden Wachstum und von der Versuchsdauer.

In Abbildung 21 wird die Entwicklung der Theobromin-, Coffein- und Gesamtalkaloidkonzentrationen in Abhängigkeit der Anzahl inokulierter BS in S^+ -Medium aufgezeigt. Kulturen mit 40 BS schneiden bei der Akkumulation von Purinalkaloiden im Medium relativ schlecht ab, erreichen diese doch nicht einmal Werte von Kulturen, die 20 BS enthalten. Die maximale Steigung der Co-, bzw. der GA-Konzentration wird nach 14 Tagen erreicht und flacht gegen Ende der Kulturdauer auf beinahe Null ab. Ebenfalls nach 14 Tagen wird in der 40-BS-Kultur die maximale Tb-Konzentration gemessen, die aber deutlich unter die Werte der mit 10 und 20 BS bestückten Kulturen zu liegen kommt (siehe Abb. 21 und Appendix G). Auch in den 10-BS- und 20-BS-Kulturen kann beobachtet werden, dass bei Erreichen der maximalen Tb-Konzentration die Co-, bzw. die GA-Kurve ihre grösste Steigung besitzt, d.h. im Medium ist die Akkumulation der Purinalkaloide zu diesem Zeitpunkt am effektivsten. Wie es scheint, ist eine Tb-Konzentration von mindestens 20 mg/l Medium eine der Voraussetzungen für eine optimale Coffeinproduktion.¹⁵ Aus Tabelle 26 kann entnommen werden, dass BS unter Salzstress (in KCl-

¹⁵ Unter **Produktion** soll immer die Differenz zwischen einer schon zu Beginn des Experimentes vorhanden Stoffmenge und der in einem späteren Zeitpunkt gemessenen Stoffmenge verstanden werden. Dabei spielt es keine Rolle, ob sich z.B. das Coffein in den BS oder im Medium befindet. Was zählt, ist jeweils die gesamte Menge in der Kultur.

und NaCl-Medium) beachtliche Mengen an Theobromin ins Medium abgeben, diesen Umstand aber nicht für eine gesteigerte Coffeinbiosynthese nutzen können: Trotz einer um 50% erhöhten Tb-Konzentration im Medium, enthalten salzgestresste Kulturen nur ein Drittel der Gesamtalkaloidkonzentration, verglichen mit der höchstproduzierenden Kultur (S^+ -Medium, Tag/Nacht-Rhythmus).

Abbildung 21: Gesamtalkaloid- und Coffeinkonzentration (A) und Theobrominkonzentration (B) in Abhängigkeit der Kulturdauer und der Anzahl inokulierter BS in S^+ -Medium (30 ml). Es wurden Mittelwerte aus 2 Ansätzen (bei 20 BS), bzw. aus 3 Ansätzen (bei 10 und 40 BS) gebildet. In Appendix G sind sämtliche Mittelwerte aufgeführt. 1: 10 BS (Inokulum: 4.31 ± 0.05 g FGI/l); 2: 20 BS (Inokulum: 8.27 ± 0.66 g FGI/l); 3: 40 BS (Inokulum: 17.42 ± 0.30 g FGI/l).

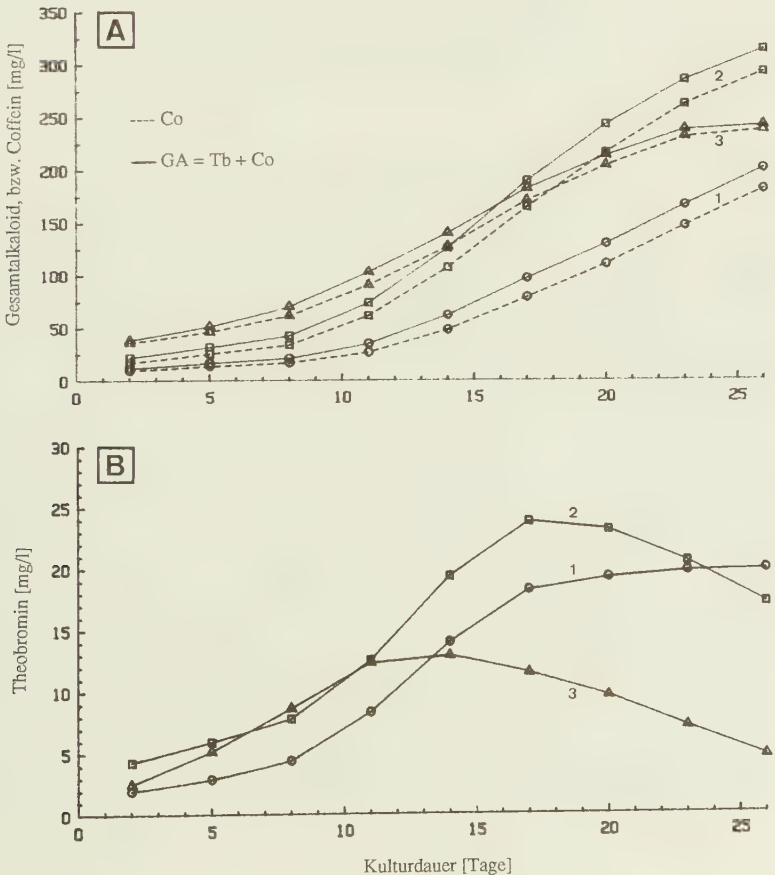


Tabelle 26: Theobromin- und Gesamtalkaloidkonzentrationen im Medium nach 26tägiger Kulturdauer unter verschiedenen Bedingungen. Bei allen Versuchen wurden 10 BS in 30 ml Medium angesetzt. Es wurden jeweils 3 Ansätze eines Versuches gemessen. Die Versuche sind in absteigender Reihenfolge der GA-Konzentration aufgeführt. T/N = Tag/Nacht-Rhythmus, DD = Dauerdunkel.

Ansatz	Licht	Konzentrationen [mg/l] von	
		Tb	GA
S ⁺	T/N	20.0 ± 1.2	182 ± 38
pH5.5	T/N	5.1 ± 1.5	87.9 ± 35.9
pH7.5	T/N	4.3 ± 0.5	77.4 ± 9.4
KCl	T/N	29.6 ± 9.7	67.6 ± 31.7
NaCl	T/N	29.8 ± 2.4	56.7 ± 4.1
oW	T/N	1.9 ± 0.5	33.5 ± 6.8
oS	T/N	2.5 ± 0.7	30.7 ± 1.9
pH3.5	T/N	nicht bestimmbar	26.6 ± 4.4 ^a
S ⁺	DD	9.4 ± 0.8	25.6 ± 1.6

^a Mittelwerte und Standardabweichungen der Coffeinkonzentrationen aus 4 Ansätzen berechnet.

Der Tag/Nacht-Rhythmus scheint die Purinalkaloidsynthese zu begünstigen, werden doch in allen, dieser Bedingung unterworfenen Versuchen höhere GA-Konzentrationen festgestellt als im Dauerdunkel-Versuch. Bemerkenswert daran ist, dass mit S⁺-Medium und einem Tag/Nacht-Rhythmus das beste Resultat erzielt wird, demgegenüber das gleiche Medium im Dauerdunkel am schlechtesten abschneidet (Tab. 26). Versetzt man S⁺-Medium mit MES und Tetramethylammoniumhydroxid (= Puffer, pH 5.5), kann eine Einbusse an Purinalkaloiden von 50% beobachtet werden. Da pH und Osmolarität im gepufferten und ungepufferten Medium beinahe gleich verlaufen (siehe 4.3.2), kommt nur der Puffer als "synthesevermindernder Faktor" in Frage.

Neben der Konzentrationsangabe, die nur über die Stoffe im Medium Auskunft gibt, ist aus physiologischer Sicht eine Gesamtbilanz der Alkaloide von Interesse. Damit werden die Alkaloide im Medium und im synthetisierenden Gewebe zu Beginn und am Ende eines Versuches berücksichtigt. Gerade bei Experimenten mit BS, die mit einem hohen Alkaloidgehalt in Kultur gebracht werden, kann mittels der Bilanz ein Produktionsfaktor f_p berechnet werden. Ist dieser grösser als 1, erfolgte eine Zunahme durch Neusynthese. Werte kleiner 1 zeugen von einem Ab- oder Umbau. Tabelle 27 zeigt Gesamtbilanzen von hochproduzierenden und nicht-produzierenden BS-Flüssigkulturen. Bei den mittelmässig produktiven Kulturen (Tab. 27: pH5.5 und pH7.5) wurde aus praktischen Gründen auf eine Gehaltsanalyse der BS am Ende der Versuchsdauer verzichtet.¹⁶

¹⁶ Bei optimalem Wachstum (vergleiche BS in S⁺-Medium) könnte der Produktionsfaktor f_p um höchsten 2 erhöht werden.

Tabelle 27: Bilanz der Purinalkaloide (Tb + Co = GA; [µg]) in BS-Flüssigkulturen. In der Bilanz werden Inokulum, Verlust durch Probeentnahme, Mediumvolumen und gegebenenfalls End-Biomasse berücksichtigt. Zur Berechnung des Mittelwertes (und der Standardabweichung) wurden jeweils 3 Kulturen analysiert.

Versuch	Start	nach 26 Tagen			
		im Medium	f_p	in Medium + BS	f_p
S ⁺ , 10 BS	426 (120)	5450 (1020)	12.8	6410 (1470)	15.0
S ⁺ , 20 BS	802 (24)	8410 (340)	10.4	11'570 (290)	14.4
S ⁺ , 40 BS	1390 (170)	6870 (400)	4.9	10'300 (1360)	7.4
oS, 10 BS	963 (47)	903 (58)	0.9	908 (59)	0.9
oW, 10 BS	936 (36)	1020 (160)	1.1	1038 (170)	1.1
pH5.5, 10 BS	558 (220)	2450 (980)	4.4	----	---
pH7.5, 10 BS	902 (58)	2300 (370)	2.5	----	---

4.3.5 Diskussion

Wie die Resultate zeigen, ist das bis anhin für Zellsuspensionen verwendete S⁺-Medium zur Kultivierung von BS und deren Sekundärstoffproduktion bestens geeignet. Der Purinalkaloidgehalt von 26 mg/g TG, erhalten nach 26tägiger Kultivierung von 10, bzw. 20 BS, liegt etwas über dem Durchschnittswert von frischgeernteten Blättern (meist unter 20 mg/g TG). Hochproduzierende Suspensionskulturen erreichen nach 18 Tagen und unter gleichen Bedingungen im besten Fall einen Alkaloidgehalt von 7 mg/g TG (FRISCHKNECHT und BAUMANN, 1980). Setzt man die Suspensionskulturen hohen Lichtintensitäten aus, so erreichen die unter "Normalbedingung" tiefproduzierenden Zellaggregate einen Gehalt von 26 mg/g TG. Zusätzlicher Salzstress (NaCl) lässt den Alkaloidgehalt sogar auf 30 mg/g TG klettern (FRISCHKNECHT und BAUMANN, 1985). Zu berücksichtigen ist dabei, dass das End-TG in der Kontrolle und unter Lichtstress beinahe gleich ist. Unter Salzstress wird eine Zunahme beobachtet, die durch die Salzaufnahme erklärt werden kann. Licht- und Salzstress zusammen geboten, haben ein tieferes End-TG zur Folge. In allen Stressversuchen wird allerdings auch die Alkaloidkonzentration im Medium erhöht, d.h. die Produktivität kann, absolut betrachtet, erhöht werden. Eine stressinduzierte Steigerung der Purinalkaloidproduktion bei BS-Flüssigkulturen konnte nicht gezeigt werden. Sowohl unter NaCl-, als auch KCl-Stress beträgt der Puringehalt am Ende der Kultur etwa 21 mg/g TG, wobei die Gesamtalkaloidkonzentration im Medium nur noch ein Drittel der bestproduzierenden BS-

Flüssigkultur erreicht (Tab. 26).¹⁷

Belichtete Kalluskulturen erreichten nach 49 Tagen einen Coffeingehalt von 70 - 73 mg/g TG, wobei im Festmedium Konzentrationen von 340 - 370 mg/l gemessen werden konnten (siehe 3.1.1.1). Unter Annahme eines exponentiellen Wachstums erreichen die BS nach 7 Wochen eine 5- bis 10fach höhere Zunahme der Biomasse (gemessen als TG), was sich positiv auf die Purinalkaloidproduktion auswirkt. Denn wie bei Suspensionskulturen (FRISCHKNECHT und BAUMANN, 1980), konnte auch bei BS-Flüssigkulturen festgestellt werden, dass die Coffeinbiosynthese eng mit dem Wachstumsprozess gekoppelt ist. BS-Flüssigkulturen können aus diesem Grunde weit höhere Gesamtmengen an Coffein produzieren und sind dadurch den Kalluskulturen überlegen. Zudem ist die Verwendung von Flüssigmedium bei der biotechnologischen Gewinnung pflanzlicher Inhaltsstoffe die einfachste Lösung, weil sämtliche Parameter leicht kontrolliert werden können. Inwiefern eine erfolgreiche, d.h. mengenmässig nutzbare Alkaloidproduktion in Blätter- oder BS-Flüssigkulturen pharmazeutisch interessanter Pflanzen (z.B. *Catharanthus roseus*) erreicht werden kann, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Eine der wichtigsten Parameter in der Gewebekultur-Technik ist die Kohlenstoffquelle. Wird unter natürlichen Luftverhältnissen gearbeitet, kann Kohlendioxid - trotz einem bei BS vermutlich intakten Photosynthesesystem - nicht als Kohlenstoffquelle herangezogen werden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob eine Assimilation unter erhöhtem CO₂-Partialdruck stattfinden kann. Obwohl Saccharose in allen Versuchen verwendet wurde, scheint auch sie nicht die optimale Kohlenstoffquelle zu sein, da einer Abnahme des Totalzuckers immer zuerst eine Spaltung in Glucose und Fructose vorausgeht. PRENOSIL et al. (1987) fanden bei tiefproduzierenden Suspensionskulturen von *Coffea arabica*, dass Saccharose, Galactose und ein 1:1-Verhältnis von Glucose und Fructose die deutlichste TG-Zunahme bewirken, dass aber mit Fructose und Lactose die höchsten Alkaloidkonzentrationen im Medium erzielt werden. Inwiefern dieses Ergebnis auf BS-Flüssigkulturen übertragen werden kann, müsste in weiteren Versuchen abgeklärt werden. Insbesondere wäre zu untersuchen, ob BS durch eine gezielte Auswahl der Zucker von der Wachstumsphase in eine Produktionsphase überführt werden können. Während der Wachstumsphase (bzw. Produktionsphase) wäre die Produktion (bzw. das Wachstum) nicht eingestellt, sondern nur suboptimal.

Weitere Parameter, wie pH oder Osmolarität, können in begrenztem Umfang variieren, ohne sichtbare Produktionseinbussen hinnehmen zu müssen. Der pH wird von den BS in

¹⁷ Es sei noch erwähnt, dass das Inokulum in den einzelnen Untersuchungen mengenmässig variierte: Bei BS-Flüssigkulturen betrug es 0.8 g TG/l (10 BS) und 1.6 g TG/l (20 BS). Für die Suspensionskulturen wurden zwischen 2.25 und 5 g TG/l verwendet (FRISCHKNECHT und BAUMANN, 1980; 1985).

den Bereich von 4.5 - 6.0 hineinreguliert. Die Verwendung von biologischen Puffern (z.B. HEPES, MES) zusammen mit TMAH zeigt nur eine leicht negative Wirkung auf das Wachstum, reduziert aber die Alkaloidproduktion um 65 - 75% (Tab. 27). Der Grund hierfür ist nicht bekannt.

Wie schon in Tabelle 21 (siehe 4.2.4) gezeigt wurde, bleibt ein Teil der Alkaloide in den BS, wobei eine Abhängigkeit vom erreichten End-TG und von den Versuchsbedingungen festgestellt werden konnte (Abb. 12, 4.2.4). BS ohne Wuchshormone im Medium zeigten, trotz steigender Biomasse und vorhandener Chlorogensäure, eine Abnahme des im Gewebe verbliebenen Coffeins. Diese Beobachtung ist nun mit Hilfe des Produktionsfaktors (Tab. 27, oW) erklärbar: Da die Biosynthese der Purinalkaloide zum Erliegen kommt ($f_p = 1.1$), fließt der gesamte Theobromin- und Coffeinpool ins Medium ab, bis ein Konzentrationsausgleich zwischen Medium und Gewebe stattgefunden hat. BS in S^+ -Medium enthalten Coffein und Theobromin in 3- bis 4fach höheren Mediumkonzentrationen. Die Einstellung des Konzentrationsgleichgewichtes zwischen BS und Medium wird in diesem Fall durch eine stete Neusynthese und die anschließende Komplexierung durch CGA verunmöglicht.

5. Zusammenfassung

An primären Kalluskulturen von *Coffea arabica* wurde die Alkaloidproduktion in Abhängigkeit von Lichtangebot (Dauerdunkel, Tag/Nacht-Rhythmus) und unterschiedlicher Wuchshormonkonzentration (in Festmedium nach MURASHIGE und SKOOG) untersucht. Neben einem leichten Ergrünen (60 - 150 µg Chlorophyll/g TG) zeigten die tagesperiodisch belichteten Kalluskulturen gegenüber den Dunkelkulturen eine verstärkte Coffeinakkumulation (70 - 73 mg/g TG). Unter allen Kulturbedingungen konnte ein starkes Gefälle der Theobromin- und Coffeinkonzentration vom Kallusgewebe ins Festmedium festgestellt werden.

Unter Anwendung einer spektrophotometrischen Methode wurden Extinktionskoeffizienten und Komplexierungskonstanten in wässriger Lösung (25°C) bestimmt. Mit Hilfe mathematischer Modelle konnte gezeigt werden, dass die Purinalkaloide Theobromin, Paraxanthin, Theophyllin und Coffein mit Chlorogensäure einen 1:1-Komplex bilden, wogegen der Theacrin-Chlorogensäure-Komplex in einem 2:1-Verhältnis vorliegt. Des weiteren wurde die Temperaturabhängigkeit der Komplexreaktion von Chlorogensäure und Coffein studiert.

In Auswaschversuchen mit Blattscheiben von *Coffea arabica* wurde die Kompartimentierung des Coffeins untersucht. Mit einer mathematisch-graphischen Methode, dem Peeling-off, konnte zwischen einem kleinen, schnellauswaschbaren und einem grossen, nur langsam ausfliessenden "Pool" unterschieden werden. Ein drittes, nicht-auswaschbares Kompartiment konnte mit dem Coffein-Chlorogensäure-Komplex in Beziehung gebracht werden. Der Komplex dürfte in der Vakuole lokalisiert sein.

In sterilen Blattscheiben-Flüssigkulturen mit verschiedenen Medien (nach MURASHIGE und SKOOG mit/ohne: Saccharose, Wuchshormone, NaCl, KCl, Puffer) konnte nach 26 Tagen eine mehr oder minder starke Abnahme der Chlorogensäure festgestellt werden. Hierdurch vermindert sich die Komplexbildung, bzw. wird vernachlässigbar. Die Verteilung des Coffeins zwischen Gewebe und Medium wird dann durch das Verhältnis von Biomasse zu Mediumvolumen bestimmt.

Es zeigte sich, dass zur erfolgreichen Kultivierung von Blattscheiben ein Tag/Nacht-Wechsel unerlässlich ist. Das einsetzende Wachstum ist Vorbedingung für die Purinalkaloid-Biosynthese. Eine Steigerung der Biosynthese durch Nährstoffmangel, Salz- oder pH-Stress ist nicht möglich, weil der Wachstumsprozess negativ beeinflusst wird. Blattscheiben-Flüssigkulturen unter Normalbedingungen weisen nach 4 Wochen einen Purinalkaloidgehalt von 26 mg/g TG auf, was etwa dem Gehalt licht- und salzstress-behandelter Suspensionskulturen von *Coffea arabica* entspricht.

6. ANHANG

6.1 Appendix A

Daten der Kurzzeit-Auswaschversuche mit je 16 BS (Ø 1 cm) in destilliertem Wasser (32 - 34 ml).

5 Wochen			6.5 Wochen		
Auswasch- dauer [h]	Co aus BS ausgewaschen		Auswasch- dauer [h]	Co aus BS ausgewaschen	
	[µg]	[%]		[µg]	[%]
0.33	30.2	3.52	0.25	22.9	2.92
0.83	55.0	6.40	0.75	41.9	5.34
1.33	72.8	8.47	1.25	60.6	7.72
1.83	84.2	9.79	1.75	78.2	9.95
2.33	103	12.0	2.25	90.9	11.6
2.83	113	13.1	2.75	103	13.2
3.33	128	14.9	3.25	113	14.4
3.83	138	16.0	3.75	117	14.9
4.33	150	17.4	4.25	131	16.7
4.83	157	18.3	4.75	141	18.0
5.33	173	20.1	5.25	153	19.4
6.00	179	20.8	5.92	167	21.3
6.42	186	21.7	6.33	172	21.9
6.92	195	22.7	6.83	169	21.5
7.42	204	23.8	7.33	---	---
7.92	211	24.5	7.83	185	23.5
21.5	355	41.3	21.4	328	41.8
Co in BS			Co in BS		
	[µg]	[%]		[µg]	[%]
Start	860	100	Start	785	100

10 Wochen			13 Wochen		
Auswasch- dauer [h]	Co aus BS ausgewaschen		Auswasch- dauer [h]	Co aus BS ausgewaschen	
	[µg]	[%]		[µg]	[%]
0.22	26.3	2.83	0.10	13.9	2.20
0.80	64.6	6.96	0.68	49.0	7.78
1.30	83.0	8.95	1.18	71.8	11.4
1.80	108	11.6	1.85	93.4	14.8
2.30	125	13.5	2.18	112	17.7
2.80	141	15.2	2.72	132	21.0
3.30	154	16.6	3.18	142	22.5
3.80	172	18.6	3.72	158	25.1
4.30	189	20.4	4.18	162	25.7
4.80	194	21.0	4.68	165	26.1
5.43	215	23.2	5.30	176	27.9
5.85	226	24.4	5.72	183	29.1
6.35	237	25.6	6.25	192	30.5
6.80	243	26.2	6.68	199	31.6
7.30	253	27.3	7.18	207	32.9
7.63	258	27.8	7.48	211	33.5
21.4	437	47.1	21.3	356	56.4
Co in BS			Co in BS		
	[µg]	[%]		[µg]	[%]
Start	927	100	Start	630	100

6.2 Appendix B

Daten von Auswaschversuchen mit 16 Blattscheiben ($\varnothing$ 1 cm) in destilliertem Wasser (33 - 34 ml) ohne Protokollierung der Auswaschkurven.

	Alter des BS-Materials [Wochen]					
	3	5.5	8	11.5	14	16.5
TG, 16 BS [mg]	50	62.3	64.5	71.0	79.9	69.5
TG/FG in %	23.2	28.9	29.8	28.2	29.9	31.3
CGA [mg/g TG]	12.3	22.0	20.4	41.2	46.9	45.2
Coffein [mg/g TG]	14.0	11.3	11.1	14.1	15.6	18.0
Co-Total, 16 BS [μ g]	700	704	809	1001	1246	1251
Co ausgewaschen ^a [%]	44.9	59.2	63.7	40.9	39.3	54.4
CGA-Total [mmol/l]	10.5	25.3	24.5	45.8	56.4	57.9
Co-Total [mmol/l]	21.8	23.6	24.2	28.5	34.2	42.1
Co-CGA-Komplex ^b [mmol/l]	4.7	9.9	9.9	16.5	21.3	25.5
CGA ^b [mmol/l]	5.8	15.4	14.6	29.3	35.1	32.4
Coffein ^b [mmol/l]	17.1	13.7	14.3	12.0	12.9	16.6
CGA komplexiert [%]	44.7	39.3	40.4	36.1	37.8	44.0
Co komplexiert [%]	21.5	42.1	40.9	58.1	62.4	60.5

^a nach 21.5 Stunden

^b zum Zeitpunkt $t = 0$; berechnet aus CGA-Total $[A]_0$ und Co-Total $[B]_0$, die in Gleichung (30) (siehe 2.3.4) eingesetzt wurden.

6.3 Appendix C

Daten zur Entwicklung der Biomasse in BS-Flüssigkulturen (10 BS/ 30 ml Medium). Der Wert nach 26 Tagen ist das Mittel von 3 Messungen (mit Standardabweichung). Alle Werte ohne Angabe der Standardabweichung sind Einzelwerte. BZ = Bezugsgrösse; TG = Trockengewicht [mg/BS]; TGZ = TG-Zunahme [%] bezogen auf das Inoculum.

Medium	BG	Kulturdauer [Tage]							
		5	8	11	14	17	20	23	26
oS	TG	4.0	---	4.0	3.8	4.4	3.8	3.4	3.0 (0.2)
	TGZ	2.0	---	3.1	-1.0	-1.8	-13	-30	-31 (5)
oW	TG	5.6	8.2	8.6	9.5	9.2	15.0	15.1	14.9 (2.2)
	TGZ	32	120	130	120	70	200	160	256 (78)
pH3.5	TG	3.5	3.7	2.8	3.5	9.5 ^a	3.7 ^b	-0.2	0.1
	TGZ	-4.1	13	-17	5.4	43 ^a	13 ^b	-4.9	-5.6
pH5.5	TG	4.8	---	---	11.7	16.4	19.5	24.9	20.0 (5.5)
	TGZ	51	---	---	230	270	390	490	427 (45)
pH7.5	TG	5.3	7.8	8.0	9.6	16.5	19.3	19.7	25.6 (2.6)
	TGZ	52	80	84	150	310	380	470	536 (55)

^a nach einer Kulturdauer von 18 Tagen

^b nach einer Kulturdauer von 21 Tagen

6.4 Appendix D

Verlauf der pH-Werte über die gesamte Kulturdauer von 26 Tagen in BS-Flüssigkulturen (10 BS/30 ml).

Medium	Start	Kulturdauer [Tage]								
		2	5	8	11	14	17	20	23	26
oS ^a	5.39	4.55	4.44	4.40	4.46	4.52	4.66	5.28	5.33	5.24
oW ^a	4.94	4.75	4.73	4.77	4.77	4.80	4.53	4.81	4.76	4.73
pH3.5 ^b	3.50	3.59	3.67	3.84	3.81	3.83	3.88	3.90	3.93	----
pH5.5 ^a	5.50	5.43	5.34	5.17	4.89	4.77	4.65	4.68	4.67	5.01
pH7.5 ^a	7.50	7.43	7.29	7.12	6.84	6.45	5.73	5.31	5.42	5.55

^a Für Mittelwerte der 2- bis 26tägigen Medien je 3 Messungen verwendet.

^b Für Mittelwerte der 2- bis 26tägigen Medien je 5 Messungen verwendet.

Verlauf der pH-Werte über die gesamte Kulturdauer von 26, bzw. 28 Tagen in BS-Flüssigkulturen (5, 10, 20 und 40 BS/ 30 ml S⁺-Medium). Für jeden Mittelwert wurden 3 Ansätze gemessen.

Medium	Start	Kulturdauer [Tage]								
		2	5	8	11	14	17	20	23	26
S ⁺ , 5 BS	5.18	---	4.71	---	4.52	4.52	4.58	---	---	4.74 ^a
S ⁺ , 10 BS	5.63	4.63	4.50	4.52	4.59	4.61	4.63	4.63	4.72	4.70
S ⁺ , 20 BS	5.63	4.51	4.49	4.50	4.47	4.54	4.53	4.69	4.77	4.85
S ⁺ , 40 BS	5.63	4.57	4.55	4.59	4.53	4.59	4.64	4.66	4.80	5.46

^a nach 28 Tagen verwendet.

6.5 Appendix E

Totalzucker (Definition siehe 2.2.5), Saccharose, Glucose und Fructose und Glu/Fru-Verhältnis in verschiedenen BS-Flüssigkulturen. Mit Ausnahme der *oS*-Versuche wurden zur Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung (in Klammern) je 3 Ansätze gemessen.

Versuch	Tage	Konzentrationen [g/l] im Medium von								Fru/Glu
		Totalzucker		Saccharose		Glucose		Fructose		
S ⁺ , 5 BS	14	30.6	(1.3)	21.3	(2.9)	4.7	(0.9)	5.1	(0.9)	1.1
	28	28.0	(1.5)	4.0	(2.3)	11.8	(0.5)	13.4	(0.6)	1.1
S ⁺ , 10 BS	14	31.9	(4.4)	20.9	(4.2)	5.6	(0.4)	6.0	(0.3)	1.1
	26	17.1	(1.8)	0.8	(0.7)	9.7	(1.6)	10.0	(0.6)	1.1
S ⁺ , 20 BS	14	24.1	(1.1)	5.9	(2.0)	9.1	(0.6)	10.1	(0.7)	1.1
	26	8.2	(3.2)	0.3	(0.2)	3.4	(1.9)	4.9	(1.6)	1.4
S ⁺ , 40 BS	14	21.1	(2.2)	1.9	(1.0)	9.4	(0.9)	10.8	(0.8)	1.2
	26	3.2	(3.9)	0.3	(0.2)	0.7	(1.0)	2.5	(2.9)	3.5
oS, 10 BS										

6.6 Appendix F

Prozentuale Trockengewichtszunahme (TGZ), Trockengewicht und Verbrauch von Totalzucker (Definition siehe 2.2.5) und von Saccharose über die gesamte Kulturdauer von 26 Tagen im *oW*-Versuch. Die prozentuale TGZ wurde mit der in Abbildung 15 erhaltenen Exponentialfunktion ($Y = 41.65 \cdot e^{0.0665 \cdot t}$) ermittelt. Der Totalzucker- und Saccharoseverbrauch wurde für den 2. Tag gleich Null gesetzt. Die Zuckerdifferenzen zwischen den Messtagen wurden über die gesamte Kulturdauer aufsummiert und ergeben die Werte in der Tabelle. Jede Zuckerdifferenz ist ein Mittelwert aus 3 Ansätzen.

<i>Tage</i>	<i>TGZ [%]</i>	<i>TG [mg]</i>	<i>Verbrauch [mg/Kultur] von</i>	
			<i>Totalzucker</i>	<i>Saccharose</i>
2	47.6	6.3	0	0
8	70.9	7.3	67	137
14	105.7	8.7	135	283
20	157.5	10.9	197	423
26	234.7	14.2	308	619

6.7 Appendix G

Mittelwerte der im Medium gemessenen Theobromin-, Coffein- und Gesamtalkaloidkonzentrationen [mg/l]. Für jeden Mittelwert wurden 3 Ansätze gemessen. Die BS wurden in 30 ml S^+ -Medium angesetzt. Bedingt durch die periodisch wiederkehrende Probeentnahme nahm das Mediumvolumen bis zum Ende der Kultur auf 25-26 ml ab.

Zeit [Tage]	10 BS			20 BS			40 BS		
	Tb	Co	GA	Tb	Co	GA	Tb	Co	GA
2	2.0	9.7	11.7	4.3	17.3	21.6	2.5	36.1	38.6
5	2.9	14.1	17.0	5.9	25.7	31.6	5.2	46.5	51.7
8	4.2	17.2	21.4	7.8	34.0	41.8	8.6	61.7	70.3
11	8.3	26.9	35.2	12.5	61.7	74.4	12.3	90.9	103
14	14.0	48.4	62.4	19.3	108	127	12.9	128	141
17	18.3	79.4	97.7	23.8	165	189	11.5	171	183
20	19.3	111	130	23.1	217	240	9.6	205	215
23	19.8	148	168	20.5	263	284	7.1	232	239
26	20.0	182	202	17.2	295	312	4.7	239	244

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ALIBERT, G.; RANJEVA, R.; BOUDET, A.M.: Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiol. Vég.* **15** (2), 279-301 (1977).
- AP REES, T.: Pathways of carbohydrate breakdown in higher plants. *MTP Int. Rev. Sci.: Plant Biochem.* **11**, 89-127 (1974)
- ARNON, D.I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 1-15 (1949)
- BAUMANN, T.W.; GABRIEL, H.: Metabolism and excretion of caffeine during germination of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Physiol.* **25** (8), 1431-1436 (1984)
- BAUMANN, T.W.; OECHSLIN, M.; WANNER, H.: Coffein und methylierte Harnsäuren: Chemische Muster während der vegetativen Entwicklung von *Coffea liberica*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **170**, 217-225 (1976)
- BAUMANN, T.W.; WANNER, H.: The 1,3,7,9-tetramethyluric acid content of cupu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). *Acta Amazonica* **10** (2), 425 (1980)
- BENESI, H.A.; HILDEBRAND, J.H.: A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 2703-2707 (1949)
- BÖSCH, Ch.: Purinalkaloidbildung und Klima. Untersuchung der jahreszeitlichen Veränderungen des Coffeinstoffwechsels von *Coffea arabica* L. mittels Stimulationsversuchen. Diplomarbeit, Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich (1985)
- BOLAY, E.: Die Vitalfärbung voller Zellsäfte und ihre cytochemische Interpretation. Sitzungsber. Öst. Akad. Wiss., Mathem.-Naturwiss. Kl., Abt. I **169**, 269-317 (1960)
- BUCKLAND, E.; TOWNSLEY, P.M.: Coffee cell suspension cultures. Caffeine and chlorogenic acid content. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **8** (3), 164-165 (1975)
- BURTSCHER, G.: Die mixotrophe Suspensionskultur von *Coffea arabica* L. Diplomarbeit, Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich (1987)
- CAVALIERI, L.F.; FOX, J.J.; STONE, A.; CHANG, N.: On the nature of xanthine and substituted xanthines in solution. *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 1119-1122 (1954)

- CECY, I.T.C.; CORREA, J.B.C.: Hemicellulosic polymers from the leaves of *Coffea arabica*. *Phytochemistry* **23** (6), 1271-1276 (1984)
- CHRISTEN, H.R.: Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie. 5. Auflage, Verlag Sauerländer und Verlag Moritz Diesterweg / Otto Salle Verlag (1977)
- CLIFFORD, N.C.: Chlorogenic acids - Their complex nature and routine determination in coffee beans. *Food Chem.* **4** (1), 63-71 (1979)
- COLONNA, J.P.: Biosynthèse et renouvellement de l'acide chlorogénique et des depsides voisins dans la genre *Coffea*. I. Incorporation du $^{14}\text{CO}_2$ dans les depsides des feuilles de caféiers Arabica et Robusta. *Café Cacao Thé* **30** (2), 83-92 (1986a)
- COLONNA, J.P.: Biosynthèse et renouvellement de l'acide chlorogénique et des depsides voisins dans la genre *Coffea*. II. Incorporation de la radioactivité de la L-Phénylalanine- ^{14}C dans l'acide chlorogénique des feuilles de caféier, en présence ou non de compétiteurs isotopiques. *Café Cacao Thé* **30** (4), 247-258 (1986b)
- DANNENBERG, H.: Zum Wirkungsmechanismus krebserzeugender Faktoren. *Deut. med. Wochschr.* **88** (13), 605-616 (1963)
- DEL MORAL, R.: On the variability of chlorogenic acid concentration. *Oecologia (Berl.)* **9**, 289-300 (1972)
- DRAGO, R.S.; ROSE, J.N.: Molecular addition compounds of Iodine. II. Recalculation of thermodynamic data on Lewis base-iodine systems using an absolute equation. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 6141-6145 (1959)
- EICHLER, O.: Kaffee und Coffein. 2. neubearbeitete Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1976)
- EISENBRAND, J.; BAUMANN, K.: Über die Wasserlöslichkeit von 3,4-Benzpyren und die Bildung eines wasserlöslichen Komplexes mit Coffein. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **140**, 158-163 (1969a)
- EISENBRAND, J.; BAUMANN, K.: Über die Bestimmung der Wasserlöslichkeit von Benzol, Naphthalin, Anthracen und Pyren und über die Bildung wasserlöslicher Komplexe dieser Kohlenwasserstoffe mit Coffein. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **140**, 210-216 (1969b)

- EISENBRAND, J.; BAUMANN, K.: Über die Bestimmung der Wasserlöslichkeit von Coronen, Fluoranthen, Perylen, Picen, Tetracen und Triphenylen und über die Bildung wasserlöslicher Komplexe dieser Kohlenwasserstoffe mit Coffein. Z. Lebensm.-Unters. Forsch. **144**, 312-317 (1970)
- EL HAMIDI, A.; WANNER, H.: The distribution pattern of chlorogenic acid and caffeine in *Coffea arabica*. Planta **61**, 90-96 (1964)
- FARKAS, G.L.; KIRALY, L.: Phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. Phytopathol. Zeits. **44**, 105-150 (1960)
- FRANKE, W.: Nutzpflanzenkunde: Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten. Subtropen und Tropen. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1981)
- FRISCHKNECHT, P.M.: Coffeinbiosynthese und Primärstoffwechsel. Eine Untersuchung über deren Zusammenhang in Gewebekulturen und Blättern von *Coffea arabica*. Dissertation, Philosophische Fakultät II, Universität Zürich (1980)
- FRISCHKNECHT, P.M.; BAUMANN, T.W.: The pattern of purine alkaloid formation in suspension cultures of *Coffea arabica*. Planta medica **40**, 245-249 (1980)
- FRISCHKNECHT, P.M.; BAUMANN, T.W.: Stress induced formation of purine alkaloids in plant tissue culture of *Coffea arabica*. Phytochemistry **24** (10), 2255-2257 (1985)
- FRISCHKNECHT, P.M.; BAUMANN, T.W.; WANNER, H.: Tissue culture of *Coffea arabica*: Growth and caffeine formation. Planta medica **31** (4), 344-350 (1977a)
- FRISCHKNECHT, P.M.; BAUMANN, T.W.; WANNER, H.: Caffeine production in tissue cultures of *Coffea arabica*. ASIC, 8th Colloque, Abidjan, 139-142 (1977b)
- FRISCHKNECHT, P.M.; ELLER, B.M.; BAUMANN, T.W.: Purine alkaloid formation and CO₂ gas exchange in dependence of development and of environmental factors in leaves of *Coffea arabica* L. Planta **156**, 295-301 (1982)
- FRISCHKNECHT, P.M.; ULMER-DUFEK, J.; BAUMANN, T.W.: Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: Expression of an optimal defence strategy? Phytochemistry **25** (3), 613-616 (1986)
- GOLD, H.: Mathematical modeling of biological systems - an introductory guidebook. Wiley, New York, 129-132 (1977)

- GORTER, K.: Beiträge zur Kenntnis des Kaffees. Ann. Chem. **358**, 327-348 (1907)
- GORTER, K.: Beiträge zur Kenntnis des Kaffees. Ann. Chem. **359**, 217-242 (1908)
- HABERMANN, H.M.: Allagochrome II: Effects of light and substrate on allagochrome and chlorogenic acid levels of incubated sunflower leaf discs. Plant Physiol. **42**, 1769-1779 (1967)
- HORMAN, I.; VIANI, R.: The caffeine-chlorogenate complex of coffee. 5. Internationales Kolloquium über Kaffee-Chemie, Lissabon, ASIC, 102-111 (1971)
- HORMAN, I.; VIANI, R.: The nature and conformation of the caffeine-chlorogenate complex of coffee. J. Food Sci. **37**: 925-927 (1972)
- JANS, B.: Untersuchungen am Milchsafte des Schöllkrautes (*Chelidonium majus* L.). Ber. Schweiz. Bot. Ges. **83**, 306-344 (1973)
- JOHNSON, T.B.: Purines in the plant kingdom: The discovery of a new purine in tea. J. Am. Chem. Soc. **59**, 1261-1264 (1937)
- KAPPELER, A.W.; BAUMANN, T.W.: Purine alkaloid pattern in coffee beans. ASIC, 11^e Colloque, Lomé, 273-279 (1985)
- KNOBLOCH, K.-H.; BERLIN, J.: Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Z. Naturforsch. **35 c**, 551-556 (1980)
- KURKDJIAN, H.; QUIQUAMPOIX, H.; BARBIER-BRYGOO, H.; PEAN, M.; MANIGAULT, P.; GUERN, J.: Critical evaluation of methods for estimating the vacuolar pH of plant cells. In: Biochemistry and function of vacuolar adenosine-triphosphate in fungi and plant. Ed.: B.P. Marin; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 98-113 (1985)
- LOOSER, E.; BAUMANN, T.W.; WANNER, H.: The biosynthesis of caffeine in the coffee plant. Phytochemistry **13**, 2515-2518 (1974)
- MATILE, Ph.; JANS, B.; RICKENBACHER, R.: Vacuoles of *Chelidonium* latex: lysosomal property and accumulation of alkaloids. Biochem. Physiol. Pflanzen **161**, 447-458 (1970)
- MUELLER, W.C.; GREENWOOD, A.D.: The ultrastructure of phenolic-storing cells fixed with caffeine. J. Exp. Botany **29**, 757-764 (1978)

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.: A revised medium for the rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* **15**, 473-497 (1962)
- PETERMANN, J.; BAUMANN, T.W.: Metabolic relations between methylxanthines and methyluric acids in *Coffea* L. *Plant Physiol.* **73**, 961-964 (1983)
- PETERMANN, J.; BAUMANN, T.W.; WANNER, H.: A new tetramethyluric acid from *Coffea liberica* and *C. dewevrei*. *Phytochemistry* **16**, 620-621 (1977)
- PFRUNDER, R.: Ein Beitrag zur Lokalisation von Coffein in den Zellen von *Coffea arabica*. Diplomarbeit, Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich (1979)
- PFRUNDER, R.; WANNER, H.; FRISCHKNECHT, P.M.; BAUMANN, T.W.: An attempt to localize caffeine in the cell by its washout kinetics. ASIC, 9^e Colloque, Londres, 169-175 (1980)
- POLITIS, J.: Untersuchung über die cytologische Bildung der Chlorogensäuren bei einigen *Scrophulariaceen* und *Convolvulaceen*. *Flora* **155**, 3-9 (1965)
- PRENOSIL, J.E.; HEGGLIN, M.; BAUMANN, T.W.; FRISCHKNECHT, P.M.; KAPPELER, A.W.; BRODELIUS, P.; HALDIMANN, D.: Purine alkaloid producing cell cultures: fundamental aspects and possible applications in biotechnology. *Enzyme*, im Druck (1987)
- RANJEVA, R.; ALIBERT, G.; BOUDET, A.M.: Métabolisme des composés phénoliques chez le pétunia. VI. Intervention des chloroplastes dans la biosynthèse de la naringénine et de l'acide chlorogénique. *Plant Science Letters* **10**, 235-242 (1977)
- RENAUDIN, J.-P.: Uptake and accumulation of an indole alkaloid, [¹⁴C]tabernanthine, by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and *Acer pseudoplatanus* L. *Plant Science Letters* **22**, 59-69 (1981)
- RENAUDIN, J.-P.; GUERN, J.: Compartmentation mechanisms of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Vég.* **20**, 533-547 (1982)
- RHODES, M.J.C.: The physiological significance of plant phenolic compounds. In: Annual proceedings of the phytochemical society of europe, Vol. 25. Eds.: C.F. van Jumeré, P.J. Lea. Clarendon Press, Oxford (1985)
- RHODES, M.J.C.; WOOLTORTON, L.S.C.: The enzymic conversion of hydroxycinnamic acids to p-coumarylquinic and chlorogenic acids in tomato fruits. *Phytochemistry* **15** (6), 947-952 (1976)

- RIZVI, S.J.H.; MUKERJI, D.; MATHUR, S.N.: Selective phyto-toxicity of 1,3,7-trimethylxanthine between *Phaseolus mungo* and some weeds. Agric. Biol. Chem. **45** (5), 1255-1256 (1981)
- ROSE, J.N.; DRAGO, R.S.: Molecular addition compounds of Iodine. I. An absolute method for the spectroscopic determination of equilibrium constants. J. Am. Chem. Soc. **81**, 6138-6141 (1959)
- SACHS, L.: Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden. 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1984)
- SHARMA, V.; STRACK, D.: Vacuolar localization of 1-sinapoylglucose: L-malate sinapoyltransferase in protoplasts from cotyledons of *Raphanus sativus*. Planta **163**, 563-568 (1985)
- SONDHEIMER, E.: Chlorogenic acid and related depsides. The Botanical Review **30** (4), 667-712 (1964)
- SONDHEIMER, E.; COVITZ, F.; MARQUISEE M.J.: Association of naturally occurring compounds, the chlorogenic acid-caffeine complex. Archives of Biochemistry and Biophysics **93**, 63-71 (1961)
- STÖCKIGT, J.; ZENK, M.H.: Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl coenzyme A and quinic acid. FEBS Lett. **42**, 131-134 (1974)
- STRACK, D.; SHARMA, V.: Vacuolar localization of the enzymatic synthesis of hydroxycinnamic acid esters of malic acid in protoplasts from *Raphanus sativus* leaves. Physiol. Plant. **65**, 45-50 (1985)
- STRASBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENK, H.; SCHIMPER, A.F.W.: Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 32. Auflage neubearbeitet von D. von Denffer, H. Ziegler, F. Ehrendorfer, A. Bresinsky. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1983)
- TAYLOR, A.O.; ZUCKER, M.: Turnover and metabolism of chlorogenic acid in xanthium leaves and potato tubers. Plant Physiol. **41**, 1350-1359 (1966)
- The Merck Index: An encyclopedia of chemicals and drugs. Ed.: P.G. Stecher, Merck & CO., Inc., Rahway, N.J., USA (1968)

- VAMOS-VIGYAZO, L.: Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. In: Critical reviews in food science and nutrition. Vol. 15, Ed.: T.E. Furia; CRC Press, 49-127 (1981)
- VAN DER STEGEN, G.H.D.; VAN DUIJN, J.: Analysis of chlorogenic acids in coffee. ASIC, 9^e Colloque, Londres, 107-112 (1980)
- WANNER, H.; PESAKOVA, M.; BAUMANN, T.W.; CHARUBALA, R.; GUGGISBERG, A.; HESSE, M.; SCHMID, H.: *O*(2).1,9-Trimethyluric acid and 1,3,7,9-tetramethyluric acid in leaves of different *Coffea* species. Phytochemistry **14**, 747-750 (1975)
- WEEVERS, T.: Die Funktion der Xanthinderivate im Pflanzenstoffwechsel. Arch. Neerl. Sci. **IIIB** (5), 111-195 (1930)
- WENT, F.W.: The experimental control of plant growth. In: Chronica Botanica, an international collection of studies in the method and history of biology and agriculture. Vol. 17, Ed.: F. Verdoorn; Waltham, Mass., USA (1957)
- WERNICKE, W.; KOHLENBACH, H.W.: Accumulation of chlorogenic acid in isolated mesophyll cells of *Ipomea batatas* Poir. Z. Pflanzenphysiol. **77**, 464-470 (1976).
- ZIMMERMAN, H.J.; KAHL, G.: Wundheilung in höheren Pflanzen. BIUZ **12**, 49-58 (1982)

Verdankung

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn PD T.W. Baumann, der mit stetem, hilfreichem Rat und Interesse zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Auch für die kritische Durchsicht des Manuskripts bin ich ihm, wie auch Herrn Prof. Ph. Matile zu herzlichem Dank verpflichtet. An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Prof. G. Wagnière für seine anregenden Diskussionen physikalisch-chemischer Probleme danken. Dank gebührt auch den Herren Prof. B. Eller, Dr. F. Keller und Dr. P.M. Frischknecht.

Ferner will ich nicht versäumen, all jenen zu danken, die in irgend einer Art und Weise das Gedeihen dieser Arbeit begünstigt haben.

Curriculum vitae

von **Andreas** Walter Kappeler, geboren am 13. Oktober 1958 in Leuggern, Bürger von Klingnau (AG)

- 1965-1969 Primarschule in Basel
- 1969-1977 Gymnasium Bäumlhof in Basel, Maturitätsabschluss Typus C
- 1977 Immatrikulation an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich, Studium mit Hauptfach allg. Botanik
- 1982 Diplom in allg. Botanik
- 1983-1987 Doktorarbeit unter der Leitung von PD T.W. Baumann am Institut für Pflanzenbiologie der Universität Zürich. Seit 1982 Assistent an diesem Institut.

Während meines Studiums besuchte ich bei folgenden Dozenten Vorlesungen, Kurse und Praktika:

Anatomie und Anthropologie: Prof. J. Biegert, Prof. St. Kubik

Biochemie: Prof. Ph. Christen, Prof. B. Gutte, Prof. R. Humbel, Prof. J. Kägi

Botanik: Prof. R. Bachofen, PD T.W. Baumann, Prof. C.D.K. Cook, Dr. W. Egger, PD B. Eller, Prof. H.-R. Hohl, Prof. Ph. Matile, Prof. R. Parish, Prof. D. Rast, PD H.P. Ruffner, Dr. F. Schanz, Prof. H. Wanner

Chemie: Prof. C.H. Eugster, Prof. H. Fischer, Prof. H.R. Oswald, PD P. Rüedi, Prof. G. Wagnière

Graphologie: Dr. U. Imoberdorf

Informatik: Dr. W.F. Arndt, Prof. K. Bauknecht, Prof. M. Marty, Prof. P.F. Meier, Dr. W. Reichart, Dr. C. Steinemann

Mathematik und Statistik: Prof E. Batschelet †, Prof. A. Steiner, Dr. H. Stocker

Mittelschulpädagogik, Psychologie: Prof. M. Greuter, Prof. H. Keller, Prof. K. Widmer †

Molekularbiologie: Dr. M. Aebi, Prof. A.M. Billeter, Prof. M. Birnstiel, Dr. G. Schaffner, Prof. W. Schaffner, Prof. Ch. Weissmann

Palaontologie: Prof. H. Rieber

Photographie: Prof. F. Tonamichel

Physik: Prof. E. Brun, Prof. W. Kündig

Toxikologie: Prof. Ch. Schlatter

Wissenschaftstheorie: Prof. H. Mohr

Zoologie: Dr. G. Bächli, Prof. H. Burla, Prof. P.S. Chen, PD A. Dübendorfer,
Dr. R.F. Keller, Prof. H. Kummer, PD B. Nievergelt, Prof. R.
Nöthiger, Prof. P. Tardent, Dr. D.C. Turner, Prof. R. Wehner, Prof.
V. Ziswiler

